



# **Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Medicina**

**Escuela Profesional de Tecnología Médica**

## **Frecuencia del gen *qnrB* y perfil de susceptibilidad a quinolonas en *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido aislados de urocultivos en el Hospital Nacional Docente Madre Niño “San Bartolomé”. Lima, Perú – 2018**

### **TESIS**

Para optar el Título Profesional de Licenciada en Tecnología Médica en el área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

### **AUTOR**

**Cyntia Mariela MAYTA FERNÁNDEZ**

### **ASESORES**

**Lic. TM Carlos Raúl SEVILLA ANDRADE**

**Lic. TM Javier Orlando SOTO PASTRANA (Coasesor)**

**Lima, Perú**

**2020**



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

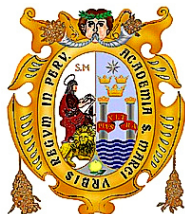
---

Mayta C. Frecuencia del gen qnrB y perfil de susceptibilidad a quinolonas en *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido aislados de urocultivos en el Hospital Nacional Docente Madre Niño “San Bartolomé”. Lima, Perú – 2018 [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Escuela Profesional de Tecnología Médica; 2020.

---

## Hoja de metadatos complementarios

Código ORCID del asesor (es)	0000-0001-9938-9922
Autor DNI (Obligatorio) Pasaporte /carnet de extranjería (sólo extranjeros)	Cyntia Mariela Mayta Fernández 70039101
Asesor DNI (Obligatorio)	Lic. T.M Carlos Raúl Sevilla Andrade 16009552
Código ORCID del autor	0000-0002-5065-1894
Grupo de investigación	Resistencia a los antimicrobianos "MICRESIS" del VRIP/UNMSM
Financiamiento	--
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación (incluirse localidades y/o coordenadas geográficas).	Av. Alfonso Ugarte 825, Cercado de Lima. Lima, Perú (Latitud 12° 2' 36" S, Longitud 77° 01' 42" W).
Año o rango de años que la investigación abarcó.	2018 - 2020
Disciplinas OCDE	Tecnología Médica de laboratorio <a href="http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.06.02">http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.06.02</a>



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
Universidad del Perú, Decana de América  
**Facultad de Medicina**  
**Escuela Profesional de Tecnología Médica**

**"AÑO DE LA UNIVERSALIZACIÓN DE LA SALUD"**



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**

Conforme a lo estipulado en el Art. 113 inciso C del Estatuto de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (R.R. No. 03013-R-16) y Art. 45.2 de la Ley Universitaria 30220. El Jurado de Sustentación de Tesis nombrado por la Dirección de la Escuela Profesional de Tecnología Médica, conformado por los siguientes docentes:

Presidente: Dr. Heli Jaime Barrón Pastor  
Miembros: Mg. Martin Gaspar Magallanes Sebastián  
Lic. Boris Moises Valdivia Vizarraga  
Asesor : Lic. Carlos Raúl Sevilla Andrade

Se reunieron en la ciudad de Lima, el día 21 de agosto del 2020, siendo las 15:00 horas, procediendo a evaluar la Sustentación de Tesis, titulado **"Frecuencia del gen *qnrB* y perfil de susceptibilidad a quinolonas en *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido aislados de urocultivos en el Hospital Nacional Docente Madre Niño "San Bartolomé". Lima, Perú – 2018"**, para optar el Título Profesional de Licenciada en Tecnología Médica en el Área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica de la Señorita:

**CYNTIA MARIELA MAYTA FERNÁNDEZ**

Habiendo obtenido el calificativo de:

.....17.....  
(En números)

.....DIECISIETE.....  
(En letras)

Que corresponde a la mención de: ...MUY BUENO....

Quedando conforme con lo antes expuesto, se disponen a firmar la presente Acta.

.....  
Presidente  
Dr. Heli Jaime Barrón Pastor  
D.N.I: 09793154

.....  
Miembro  
Mg. Martin Gaspar Magallanes Sebastián  
D.N.I: 21811014

.....  
Miembro  
Lic. Boris Moises Valdivia Vizarraga  
D.N.I: 25557178

.....  
Asesor de Tesis  
Lic. Carlos Raúl Sevilla Andrade  
D.N.I: 16009552

**Datos de plataforma virtual institucional del acto de sustentación: Datos de la plataforma virtual institucional del acto de sustentación:**

https: <https://medical-int.zoom.us/j/99484751913>

ID:

Grabación archivada en:



**UNMSM**

Firmado digitalmente por PAREDES  
ARRASCUÉ Jose Antonio FAU  
20148092282 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 07.12.2020 15:45:10 -05:00



**UNMSM**

Firmado digitalmente por CORNEJO  
VALDIVIA DE ESPEJO Angela Rocio  
FAU 20148092282 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 31.08.2020 10:46:21 -05:00

## DEDICATORIA

*“La sabiduría no es un producto de la educación, sino del intento de toda la vida para adquirirla”, Albert Einstein.*

*A Dios, quien guía e ilumina mi camino.*

*A mis padres, Cery Fernández Quispe y Grober Mayta Soto, por su amor infinito y apoyo incondicional en todas las metas que me propongo.*

*A mis abuelos, aunque no estén conmigo, sé que siempre cuidan de mí.*

*A mi familia.*

*Para ustedes va dedicado todo.*

## AGRADECIMIENTOS

*A Dios, por guiarme por el buen camino y cuidar siempre de mi familia y mi persona.*

*A mis padres por siempre confiar en mí, por los sacrificios que hacen para ser cada día mejor y sus consejos en mi camino de formación para ser una profesional. A mis hermanas Evelyn, Estefani y mi hermano Sander por sus palabras de aliento y siempre estar ahí para cuanto los necesite.*

*A mi abuela, mis tíos y primos por sus palabras de motivación y sus consejos durante este proceso. Gracias tío Carlos Mayta "Wanka" por siempre acompañarme y celebrar cada uno de mis logros.*

*Al Lic. TM. Carlos Raúl Sevilla, por permitir ser mi asesor y guiarme desde el inicio de mi trabajo de tesis. Gracias por su orientación, paciencia, tiempo y dedicación.*

*Al Lic. TM. Javier Soto Pastrana, por sus enseñanzas, disponibilidad de tiempo y sus recomendaciones para con mi tesis.*

*A Julio Jairzinho Montoya Alvarado, por su compañía y motivación durante el proceso de mi tesis.*

*Al Dr. Jorge Alarcón Villaverde Director del Centro de Investigaciones Tecnológicas, Biomédicas y Medioambientales (CITBM) y Mg. Milagros Zavaleta Apestegui coordinadora de Investigación de Biotecnología y Salud - CITBM por el apoyo y facilidades en el LEMyG - CITBM para la ejecución de mi trabajo de tesis.*

*A la Dra. Hilda Solis Acosta Directora del Departamento Académico de Microbiología Médica y a la Dra. Vilma Béjar Castillo Directora del Instituto de Medicina Tropical Daniel Alcides Carrión por su colaboración en el préstamo de las instalaciones del Laboratorio del Instituto de Medicina Tropical Daniel Alcides Carrión.*

*A la Dra. Gisselle H. Díaz Inca, Jefe del servicio de Patología Clínica, por permitirme realizar mi trabajo de tesis en el servicio de Microbiología del Hospital Docente Madre Niño Infantil “San Bartolomé”.*

*A la Lic. TM. Esther Valencia Bazalar, por todas sus enseñanzas y recomendaciones para realizar mi tesis.*

*A la Srta. Renatta Rebeca Rafaella Ortiz Huiza, egresado de Lingüística de la Facultad de Letras de la UNMSM por la revisión lingüística de esta tesis.*

*Al personal técnico del Departamento Académico de Microbiología Médica, Sra. Albina Arangues Tenemas, Srta. Ana María Arangues Tenemas por apoyarme durante la ejecución de tesis. Gracias por tratarme con amabilidad y calidez.*

*A Klarissa García por el apoyo, consejo y su aliento para culminar mi tesis y cumplir mis metas. A todos mis amigos de SISOL y CIRTRAMEF, por siempre alentarme a culminar mi tesis.*

*Al Mg. Alejandro Almerco por siempre estar disponible y apoyarme durante la ejecución de mi trabajo de tesis. A Luis Velásquez y la Lic. Consuelo Chávez por sus recomendaciones y apoyo para la ejecución de mi tesis.*

*A mis amigos y amigas que siempre estuvieron alentándome en cada paso que daba durante mi formación como profesional.*



Agradecer a mi Alma Máter, la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Decana de América, por acogerme en sus aulas y brindarme una educación de calidad.

Agradecer al Hospital Nacional Docente Madre Niño Infantil “San Bartolomé”, por brindarme las facilidades y la oportunidad para realizar la ejecución de mi trabajo de tesis.

Agradecer al Centro de Investigaciones Tecnológicas, Biomédicas y Medioambientales - CITBM, por el apoyo brindado a través de sus Investigadores y el soporte tecnológico.

Al Grupo de Investigación “Resistencia a los antimicrobianos MICRESIS” del Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por el apoyo brindado en asesoría y recursos.

# ÍNDICE

	Páginas
DEDICATORIA .....	III
AGRADECIMIENTOS .....	IV
ÍNDICE .....	VII
LISTA DE TABLAS .....	IX
LISTA DE GRÁFICOS .....	X
LISTA DE FIGURAS .....	X
LISTA DE FOTOGRAFÍA.....	XI
<b>CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. DESCRIPCIÓN DE LOS ANTECEDENTES.....	2
1.2. IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN .....	5
1.3. OBJETIVOS .....	7
1.3.1. OBJETIVO GENERAL .....	7
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
1.4. BASES TEÓRICAS.....	7
1.4.1. BASE TEÓRICA .....	7
1.4.2. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS .....	32
1.4.3. FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS .....	34
<b>CAPÍTULO II: MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
2.1. DISEÑO METODOLÓGICO .....	36
2.1.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	36
2.1.2. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN .....	36
2.1.3. POBLACIÓN .....	36
2.1.4. MUESTRA Y MUESTREO .....	36
2.1.5. VARIABLES .....	37
2.1.6. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS .....	37

2.1.7.	PROCEDIMIENTOS Y ANÁLISIS DE DATOS: .....	38
2.1.8.	CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	41
<b>CAPÍTULO III: RESULTADOS.....</b>		<b>42</b>
<b>CAPITULO IV: DISCUSIÓN.....</b>		<b>54</b>
4.	DISCUSIÓN .....	55
<b>CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>		<b>61</b>
5.1.	CONCLUSIONES .....	62
5.2.	RECOMENDACIONES .....	63
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>		<b>64</b>
<b>ANEXOS .....</b>		<b>76</b>

## LISTA DE TABLAS

**Tabla N° 1.** Método fenotípico por disco difusión para la determinación de BLEE, CLSI 2018.

**Tabla N° 2.** Método fenotípico por microdilución en caldo para la determinación de BLEE, CLSI 2018.

**Tabla N° 3.** Punto de corte de betalactámicos - disco difusión, según CLSI 2018.

**Tabla N° 4.** Punto de corte de betalactámicos - CMI, según CLSI 2018.

**Tabla N° 5.** Clasificación de quinolonas y espectro de acción.

**Tabla N° 6.** Punto de corte de quinolonas - disco difusión, Kirby Bauer, según CLSI 2018.

**Tabla N° 7.** Cebadores (*Primers*) utilizados para determinar el gen *qnrB*.

**Tabla N° 8.** Frecuencia del gen *qnrB* de acuerdo al perfil de susceptibilidad a fluoroquinolonas.

**Tabla N° 9.** Frecuencia del gen *qnrB* de acuerdo al género.

**Tabla N° 10.** Frecuencia del gen *qnrB* de acuerdo al grupo etario.

**Tabla N° 11.** Frecuencia del gen *qnrB* de acuerdo a la procedencia del paciente.

**Tabla N° 12.** Presencia del gen *qnrB* y el perfil de susceptibilidad de las quinolonas.

**Tabla N° 13.** Composición del master mix para el gen *qnrB*.

**Tabla N° 14.** Protocolo de la PCR del gen *qnrB*.

## LISTA DE GRÁFICOS

**Gráfica N° 1.** Perfil de susceptibilidad a quinolonas en *Escherichia coli* productoras de BLEE del servicio de Microbiología del HONADOMANI “San Bartolomé”.

**Gráfica N° 2.** Frecuencia del perfil de susceptibilidad de los antibióticos en *Escherichia coli* productoras de BLEE que presentan el gen *qnrB*.

**Gráfica N° 3.** *E. coli* productora de BLEE de acuerdo al género.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura N° 1.** Estructura química básica de las quinolonas.

**Figura N° 2.** Composición química y acción antimicrobiana de las quinolonas.

**Figura N° 3.** Cronología del desarrollo de las quinolonas.

## LISTA DE FOTOGRAFÍA

**Fotografía N° 1.** Electroforesis de la optimización de concentración de los *primers qnrB*.

**Fotografía N° 2.** Electroforesis de optimización de la concentración del  $MgCl_2$ .

**Fotografía N° 3.** Electroforesis del gen *qnrB* de los aislamientos de *Escherichia coli* productoras de BLEE.

**Fotografía N° 4.** Electroforesis de los aislados de *Escherichia coli* productoras de BLEE con presencia del gen *qnrB*.

**Fotografía N° 5.** Cultivo de aislados de *Escherichia coli* productoras de BLEE en medios de TSA y CHROMagar<sup>TM</sup>.

**Fotografía N° 6.** Método de Jarlier para la detección de BLEE.

**Fotografía N° 7.** Antibiograma de *Escherichia coli* productoras de BLEE para la determinación del perfil de susceptibilidad a quinolonas.

**Fotografía N° 8.** Procesamiento del proyecto de tesis en el Instituto de Medicina Tropical Daniel Alcides Carrión.

## RESUMEN

**Introducción:** La presencia de genes plasmídicos juega un rol importante en la diseminación de mecanismos de resistencia bacteriana, poniendo en riesgo al tratamiento con antimicrobianos. El gen *qnrB* es un gen plasmídico que actúa a nivel de las topoisomerasas bacterianas, permitiendo que se seleccionen mecanismos de alto nivel de resistencia bacteriana a quinolonas. Este gen puede transferirse junto a genes responsables de las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y otros mecanismos de resistencia bacteriana, por lo que estarían causando multirresistencia bacteriana y disminuyendo las opciones terapéuticas. **Diseño:** Estudio prospectivo, observacional, descriptivo y transversal. **Objetivo:** En el presente estudio se buscó determinar la frecuencia del gen *qnrB* y perfil de susceptibilidad a quinolonas en *Escherichia coli* productoras de BLEE aislados de urocultivos en el Hospital Nacional Docente Madre Niño “San Bartolomé”, 2018. **Método:** Se estudiaron 82 aislados de *Escherichia coli* productoras de BLEE que fueron obtenidos de urocultivos del HONADOMANI “San Bartolomé” durante el periodo junio – agosto del 2018. A todos los aislados se les realizó la prueba de susceptibilidad a quinolonas y posteriormente se realizó la detección gen *qnrB* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). **Resultado:** El gen *qnrB* fue encontrado en 9 de los 82 aislados (10,90%). El 66,67% de los aislados que presentaron el gen *qnrB*, fue resistente a al menos una quinolona. Todos los aislados que presentaron el gen *qnrB* fueron resistentes a cefotaxima en el 100%, sin embargo, fueron sensibles a aminoglucósidos y carbapenémicos. **Conclusiones:** El gen *qnrB* es frecuente en el 10,9% de los aislados de *Escherichia coli* productoras de BLEE y el perfil de susceptibilidad de estos fue resistente en el 77,78% para quinolonas de primera generación y levofloxacin; mientras que el 66,67% del total de aislados fueron resistentes a quinolonas de segunda y cuarta generación.

**Palabras clave:** Quinolona, betalactamasas, plásmidos, *Escherichia coli* (fuente: DeCS BIREME).

## ABSTRACT

**Introduction:** The presence of plasmid genes plays an important role in the dissemination of bacterial resistance mechanisms, putting antimicrobial treatment at risk. The *qnrB* gene is a plasmid gene that acts at the level of bacterial topoisomerases, allowing mechanisms of high level of bacterial resistance to quinolones to be selected. This gene can be transferred together with genes responsible for extended spectrum betalactamases (ESBL) and other mechanisms of bacterial resistance, thus causing bacterial multidrug resistance and reducing therapeutic options. **Design:** Prospective, observational, descriptive and cross-sectional study. **Objective:** In the present study, we sought to determine the frequency of the *qnrB* gene and the profile of susceptibility to quinolones in *Escherichia coli* producing ESBL isolated from urine cultures at the National Teaching Hospital Mother Child “San Bartolomé”, 2018. **Method:** 82 isolates of *Escherichia coli* that produce ESBL were studied and obtained from urocultures of the HONADOMANI “San Bartolomé” during the period June – August 2018. All the isolates were tested for susceptibility to quinolones and then the *qnrB* gene was detected using the polymerase chain reaction (PCR). **Results:** The *qnrB* gene was found in 9 of the 82 isolates (10,9%). 66,67% of the isolates that presented the *qnrB* gene were resistance to at least one quinolone. All isolates that presented the *qnrB* gene were 100% resistant to cefotaxime, however, they were sensitive to aminoglycosides and carbapenems. **Conclusions:** The *qnrB* gene is frequent in 10,90% of *Escherichia coli* isolates that produce ESBL and their susceptibility profile was resistant in 77,78% for first generation quinolones and levofloxacin; while 66,67% of the total isolates were resistant to second and fourth generation quinolones.

**Keywords:** Quinolone, betalactamases, plasmids, *Escherichia coli* (Source: MeSH NLM).



# **CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN**

## 1.1. DESCRIPCIÓN DE LOS ANTECEDENTES

La resistencia bacteriana a los antimicrobianos es un problema mundial, cuya principal causa es el uso desmedido de los antibióticos. Frente al ambiente desfavorable, las bacterias se seleccionan y desarrollan mecanismos de resistencia para su supervivencia, siendo la más frecuente, la resistencia a los betalactámicos producidas por betalactamasas.

Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) son enzimas que han sido encontradas en más del 50% de enterobacterias en nuestro país, generando resistencia en varios betalactámicos <sup>(1)(2)</sup>. Los genes de este mecanismo de resistencia pueden ser transferidos mediante plásmido junto a otros genes como *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, *oqxA* y *oqxB*, que también se diseminan de la misma manera, contribuyendo a la multirresistencia bacteriana.

La resistencia a quinolonas se da principalmente por mutaciones en el cromosoma, sin embargo, el mecanismo de resistencia mediante el plásmido es un problema en la actualidad, por la velocidad de su propagación debido a que son usados comúnmente en el sector salud e industrial. Como consecuencia de ello, las bacterias resistentes a quinolonas se están diseminando en poblaciones remotas donde no existía el consumo de este antibiótico, encontrándolos incluso en pacientes sanos como parte de su microbiota.

La asociación de la resistencia a quinolonas y BLEE es uno de los motivos por los cuales, se recomienda no hacer uso de quinolonas en pacientes con infecciones por bacterias productoras de BLEE, para evitar la multirresistencia bacteriana. En diferentes estudios, se ha buscado la asociación de estos dos mecanismos de resistencia, por lo que se ha encontrado la presencia del gen *qnr* en aislados bacterianos con BLEE (*bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>) dentro de un mismo plásmido.

En el estudio realizado por Pallecchi et al. (2011) en Amazonas (Perú), hallaron al gen *qnrB* en el 32% (38/120) del total de las muestras fecales de los pobladores, y a *Escherichia coli* en el 76% (29/38) de los *qnrB* positivos. Estos aislamientos presentaron resistencia a ciprofloxacino en más del 50%, mientras que para ácido nalidíxico, el 97% fue resistente. Este estudio nos demuestra la alta prevalencia del gen *qnrB* en enterobacterias comensales de pobladores de esta zona, en la cual no existe presión selectiva evidente <sup>(3)</sup>.

En otro estudio realizado por Silva et al. (2013) en México, determinaron que de 112 enterobacterias productoras de BLEE aislados de pacientes pediátricos, el 15,1% presentó el gen *qnr*, siendo el 13,6% pertenecientes a *Escherichia coli*. Además, del total de enterobacterias que presentaron el gen *qnr*, el 94,1% fueron del tipo *qnrB*. En este estudio Silva et al. encontraron al gen *qnr* junto al gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> <sup>(4)</sup>.

En el estudio realizado por Andres et al. (2013) en Argentina, se encontró que de los 105 aislamientos, el 57% presentaban al menos un gen PMQR, de los cuales en 36 aislamientos, se encontraron al gen *qnr*; en 5 aislamientos, al gen *aac(6')-Ib-cr* y en 19 aislamientos a ambos genes, siendo el gen *qnrB* el 47,6% (50/105). Además, determinaron aislamientos productoras de BLEE en el 38% del total de aislados, y al asociarlos a los genes PMQR se encontraron el 78% <sup>(5)</sup>.

En el estudio publicado por Rincon et al. (2013) en Argentina, determinaron que de 207 aislados de enterobacterias en el 2010, se confirmó que 50 aislados eran productores de BLEE y que el 66% de la enterobacterias aisladas tenían BLEE y al menos un determinante de PMQR, del cual el gen *qnrB* se halló en 38% (19/50) aislados. Se encontraron 5 variantes de *qnrB*: *qnrB2* fue el más prevalente con el 42,10% seguido de *qnrB19* (31,57%), *qnrB10* (15,78%), *qnrB1* (5,26%) y *qnrB6* (5,36%) <sup>(6)</sup>.

En otro estudio realizado por Rezazadeh et al. (2016) en Irán en las provincias de Qazvin y Zanjan, determinaron que el 67,5%; 44,5%; 44% y 58% presentaron

resistencia a ácido nalidíxico, norfloxacin, ciprofloxacina y gatifloxacina, respectivamente. Además, se encontró que la resistencia a quinolonas de alto nivel fue de 33,1%; mientras que para resistencia a quinolonas de bajo nivel fue 52,2%. En este estudio, también, se demostró que existe baja prevalencia del gen *qnr* en *Escherichia coli* resistente a quinolona, siendo 4 cepas pertenecientes al gen *qnrS1*, y ninguno de *qnrA* y *qnrB* <sup>(7)</sup>.

En un estudio realizado por García et al. (2018) en Venezuela, determinaron que de 104 enterobacterias aisladas, el 55,8% fue *Escherichia coli*. En el perfil de susceptibilidad, obtuvieron que el 72,4% de todas las cepas de *Escherichia coli* fueron resistentes a ácido nalidíxico y que el 67,2% fue resistente a ciprofloxacina. La presencia del gen *qnrB* del total de aislados fue el 33,6%, mientras que la presencia del gen *qnrA* fue 0,9%. Además, de los aislados que presentaron *qnrB*, el 45,7% fue *Escherichia coli*, siendo el más frecuente <sup>(8)</sup>.

En el estudio realizado por FarajzadehSheikh et al. (2019) en Irán, encontraron 167 aislamientos de *Escherichia coli* en 200 muestras, en los cuales se halló un 59,8% de genes *qnr*, siendo *qnrA* el 17%; *qnrB*, el 46% y *qnrS*, el 68%. Además, el 58% de los genes *qnr* eran también productoras de BLEE <sup>(9)</sup>. En otro estudio realizado por Malekzadegan et al. (2019) en Irán, encontraron que el 33,1% y 12,4% de los aislamientos presentaban el gen *qnrS* y *qnrB*, respectivamente, mientras que para el gen *qnrA* no se halló ninguno. Además, en la prueba de susceptibilidad, se obtuvo que el 71,9% fue resistente a ácido nalidíxico; el 48,4%, a ciprofloxacina; y el 47,9% a levofloxacina <sup>(10)</sup>.

Y por último, en un estudio publicado por Toribio et al. (2019), en Lima (Perú), determinaron que del total de enterobacterias productoras de CTX-M aislados en un hospital pediátrico (agosto del 2012 - enero del 2013), el 48,5% (67/138) presentó el gen *qnr*. De los cuales el 56,7% presentó el gen *qnrB* (38/67), siendo los aislados más frecuentes la *Klebsiella* spp. (22/38) y *Escherichia coli* (13/38).

También se encontraron a los genes de *qnrS* con 71,6% (48/67) y ninguno del gen *qnrA* <sup>(11)</sup>.

## 1.2. IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN

En estos últimos años están apareciendo bacterias resistentes y multirresistentes a antimicrobianos como resultado de la presión selectiva, que busca nuevas formas de defenderse de la acción antimicrobiana. Las BLEE son un ejemplo de cómo las bacterias se han ido defendiendo a través del tiempo, de los cuales la *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* fueron los más frecuentes en seleccionar estos mecanismos de resistencia bacteriana, por ello se ha visto la necesidad de usar otras opciones terapéuticas.

En el 2006, un estudio realizado por el Instituto Nacional de Salud (INS) en hospitales del MINSA y ESSALUD, se encontró que la resistencia a ciprofloxacino fue del 71% <sup>(12)</sup>. Luego en el 2014, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó que nuestro país presentaba el 58,5% de *E. coli* resistentes a fluoroquinolonas de pacientes con infección en el tracto urinario atendidos en el año 2010 <sup>(13)</sup>; ambos estudios nos muestran la elevada frecuencia de resistencia a fluoroquinolonas en el Perú.

El incremento de la resistencia bacteriana es una preocupación actual en diferentes partes del mundo, por lo cual, la Organización Mundial de la Salud en el 2015, con la resolución WHA68.7 de la 68° Asamblea Mundial de la Salud, aprobó el “Plan de Acción Mundial sobre la Resistencia a Antimicrobianos” <sup>(14)</sup>, para mejorar la eficacia de los tratamientos y disminuir la resistencia bacteriana a antibióticos.

En el Perú, también se han tomado medidas al respecto, mediante el Decreto Supremo N° 010-2019-SA, con la ley 26842, donde aprobaron el “Plan Multisectorial para enfrentar la Resistencia a los antimicrobianos en los años 2019 - 2021” <sup>(15)</sup>. Además, la Ley 29459, de la Dirección general de

Medicamentos, Insumos y Drogas (DIGEMID), en el “Petitorio nacional único de medicamentos esenciales de aplicación en el país” <sup>(16)</sup>, clasifica a las quinolonas, fluoroquinolonas, cefalosporinas de tercera generación y carbapenémicos en el grupo con alto potencial de resistencia, por lo que se debe priorizar en su contención.

En varios estudios se ha visto la relación entre la resistencia a quinolonas y las BLEE encontrándolos en un mismo plásmido; donde el gen plasmídico *qnr* ha sido encontrado junto a otros genes que producen BLEE de tipo CTX-M, SHV o TEM <sup>(17)</sup>. Los genes plasmídicos confieren un bajo nivel de resistencia a las quinolonas, la importancia de estos genes radica en la presión selectiva al momento de usar quinolonas, por lo que estarían generando niveles de resistencias más altos y que junto a otros mecanismos de resistencia como las betalactamasas se denominaría multirresistencia bacteriana, un grave problema de salud que va en aumento.

El propósito del presente trabajo es brindar información sobre la presencia del gen *qnrB*, cuya frecuencia está en aumento, contribuyendo con la resistencia bacteriana frente a las quinolonas. Además, se evaluará la presencia del gen *qnrB* asociada a la corresponsencia entre quinolonas y betalactamasas de espectro extendido (BLEE) aislados de *Escherichia coli*, problemática actual en Latinoamérica y Perú por su elevada prevalencia; debido a que la aparición de estos mecanismos de resistencia bacteriana disminuye las opciones terapéuticas antimicrobianas y promueve el uso de antibióticos de mayor potencia, con el aumento de nuevos mecanismos de resistencia y corresponsencia bacteriana <sup>(18)</sup>.

### 1.3. OBJETIVOS

#### 1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia del gen *qnrB* y perfil de susceptibilidad a quinolonas en *Escherichia coli* productoras de BLEE aislados de urocultivos en el Hospital Nacional Docente Madre Niño “San Bartolomé”.

#### 1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la frecuencia del gen *qnrB* en aislados de *Escherichia coli* productoras de BLEE resistentes y sensibles a quinolonas.
- Determinar la frecuencia de *qnrB* de acuerdo al género, grupo etario, procedencia de los pacientes y resistencia a fluoroquinolonas.
- Determinar el perfil de susceptibilidad a las quinolonas en aislamientos de *Escherichia coli* productoras de BLEE.
- Determinar la frecuencia de BLEE en aislados de *Escherichia coli* de urocultivos.

### 1.4. BASES TEÓRICAS

#### 1.4.1. BASE TEÓRICA

##### ***Escherichia coli***

Es un bacilo Gram negativo que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y se caracteriza por ser anaerobio facultativo, oxidasa negativo e indol positivo. En su mayoría presentan movilidad a 36 °C, no producen hidrógeno sulfurado, no

metabolizan el citrato, producen gas, el 100% acidifican la glucosa, el 50% fermentan la sacarosa y el 95% fermentan la lactosa <sup>(19)</sup>.

Esta bacteria se puede encontrar en el intestino como parte de la microbiota en animales de sangre caliente <sup>(20)</sup>, pero también existen otras *Escherichia coli* en menor cantidad que son productoras de la toxina Shiga y pueden causar intoxicaciones a este nivel, del cual a partir de una infección en el aparato digestivo puede conllevar a una infección del tracto urinario.

#### PATOTIPOS DE *Escherichia coli*

“La *Escherichia coli* presenta seis patotipos entre entéricas y diarreicas: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) y *E. coli* Enteroagregativa (EAEC); y dos patotipos patogénicos extra intestinal (EXPEC): *E. coli* meningitis neonatal (NMEC) y *E. coli* uropatógena (UPEC)” <sup>(21)</sup>. La EXPEC es el patógeno extraintestinal bacteriano causante de la mayoría de infecciones en el tracto urinario, además, estos pueden invadir diferentes tejidos y causar infección a cualquier edad <sup>(22)</sup>. La UPEC, un patotipo de la EXPEC, genera infecciones urinarias extra hospitalarias con un 80-90% de casos debido a la presencia de factores de virulencia que determinan su patogenicidad <sup>(23)</sup>.

#### INFECCIONES EN TRACTO URINARIO POR UPEC

Las infecciones del tracto urinario son causadas mayormente por bacterias patógenas, los cuales afectan a un aproximado de 150 millones de personas cada año y es considerada la causa principal de morbilidad en niños, hombres mayores y mujeres a cualquier edad <sup>(24)</sup>. Estas infecciones pueden ser causados por bacterias Gram positivas y Gram negativas, siendo la *Escherichia coli* el más prevalente seguido de “*Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus* del grupo B, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Staphylococcus aureus*” <sup>(24) (25)</sup>.



La colonización del tracto urinario por UPEC puede infectar la vejiga, los uréteres y los riñones causando infecciones graves a este nivel como una pielonefritis aguda, lo que podría conllevar a la insuficiencia renal y muerte. Estos microorganismos presentan factores de virulencia como las adhesinas, flagelos, toxinas, hierro, polisacáridos de superficie, vesículas de membrana externa, pili y receptores de sideróforos <sup>(21) (23)</sup>; también es importante mencionar que las *E. coli* responsables de las infecciones del tracto urinario presentan elevada prevalencia de resistencia antimicrobiana en el mundo.

En un estudio en Arabia Saudita, se encontró a la UPEC en cantidades mayores al 50% en infecciones del tracto urinario de pacientes adultos y niños, que además presentaban un incremento de resistencia a antibióticos, encontrándose *E. coli* multidrogo resistente (MDR) <sup>(26)</sup>. La presencia de *E. coli* resistentes a múltiples fármacos es un problema mundial que está en aumento entre pacientes hospitalarios y ambulatorios, siendo la más frecuente la resistencia a los betalactámicos, que en presencia de la resistencia de otras dos o más familias de antibióticos estaríamos refiriéndonos a una *E. coli* MDR.

## **MECANISMOS DE RESISTENCIA**

### **BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE)**

#### **DEFINICIÓN**

Es una familia de enzimas producidas por bacilos Gram negativos, como resultado de mutaciones en los genes SHV, TEM, CTX-M y otros; estos actúan hidrolizando antibióticos betalactámicos. Pueden ser cromosómicas y extracromosómicas, los cuales estos últimos pueden ser mediados por plásmido o transposones <sup>(27) (28) (29)</sup>.

Las BLEE son derivadas de las betalactamasas tipo TEM-1, TEM-2 y SHV-2 que, a diferencia de otros mecanismos, estas hidrolizan cefalosporinas de amplio espectro

(primera, segunda, tercera y cuarta generación) y monobactámicos, pero son sensibles a las cefamicinas y carbapenémicos; y además son inhibidas por ácido clavulánico y tazobactam <sup>(28)</sup> <sup>(29)</sup>. La CTX-M es otro tipo de betalactamasas que pertenece a este grupo y actúan frente a cefotaximas.

## HISTORIA

El uso del antibiótico inició en 1928, cuando Alexander Fleming realizaba experimentos con estafilococos. Alexander Fleming, por accidente, dejó una placa abierta cerca de la ventana, y esta se contaminó con esporas de moho, luego al observarlas se dio cuenta de que el moho inhibía el crecimiento de las bacterias, por lo que las aisló e identificó como miembro del género *Penicillium*. En 1929, Fleming publicó en el *British Journal of experimental Pathology* su descubrimiento sobre la penicilina <sup>(30)</sup>. Años más tarde Abran y Chain descubren la resistencia bacteriana a las penicilinas, al cual se le denominó como “penicilinasas” <sup>(31)</sup>.

Para combatir la resistencia bacteriana, a partir del año 1960 se empezó a producir nuevos antibióticos sintéticos realizando modificaciones en la penicilina G original dando lugar a la meticilinas, ampicilina y las cefalosporinas de primera generación <sup>(32)</sup>. Poco tiempo después, surgió la resistencia bacteriana a estos últimos antimicrobianos, por lo que se ha continuado con la búsqueda de nuevos antibióticos.

En 1963, se aíslan las betalactamasas de tipos TEM-1, SHV-1 y PSE-1 en *E. coli* <sup>(33)</sup>. Posteriormente, se identificaron enzimas resistentes a penicilinas y cefalosporinas de primera generación, pero sensibles a las cefalosporinas de tercera generación, a los cuales se les denominó como betalactamasas de espectro ampliado (BLEA). Estas bacterias pueden transferir sus genes de resistencia a otros mediante un plásmido, diseminándose la resistencia a estos tipos de antibióticos betalactámicos. Años después, en 1978, inicia la “era de la oxymiocefalosporinas, cefamicinas, monobactámicos, carbapenémicos y los inhibidores de betalactamasas” <sup>(33)</sup> <sup>(34)</sup>.

Las mutaciones en los genes *bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>TEM-2</sub> y *bla*<sub>SHV-1</sub> productoras de betalactamasas tuvieron como resultado a las betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Es así que, en el año 1983, en Alemania, se identifica al gen SHV-2, derivado del SHV-1, el cual confiere resistencia a ceftazidima, ceftriaxona, cefotaxima y el aztreonam <sup>(35)</sup>. En 1984, se descubre al TEM-3 como otro gen productor de BLEE derivado del TEM-2, siendo así el SHV-2 y el TEM-3 los genes más frecuentes hasta los años 90 <sup>(35)</sup>. Ya en el año 1989, Phihilippon et al. introducen por primera vez el término betalactamasas de espectro extendido (BLEE) <sup>(27)</sup>.

Además de los genes ya mencionados, en 1989, se identificó al gen *bla*<sub>CTX-M</sub>, el cual no se relacionaba con los dos anteriores, sin embargo, hoy en día ha tomado gran importancia por su aumento en nuestro país y el mundo durante los últimos años <sup>(27)</sup> <sup>(36)</sup>. Existen otros genes causantes de BLEE, como PER, VEB-1, BES-1, SFO-1, TLA-1, CME-1, GES/IBS, los cuales son de menor prevalencia <sup>(27)</sup>.

La aparición de nuevos genes productores de betalactamasas, el aumento de bacterias productoras de betalactamasas y su corresponsencia con otros antibióticos son problemas que van en aumento en estos últimos años, por lo que se debería prestar más atención y buscar opciones para hacer frente a esta amenaza.

#### TIPOS DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO

- TEM: Fue denominado en sus inicios como CTX-1 por su actividad contra la cefotaxima <sup>(35)</sup>; es derivado de TEM-1 y TEM-2 y, actualmente, está denominado como el TEM-3. Es el más frecuente en bacterias Gram negativas y responsable del 90% de resistencia de *E. coli* a ampicilina <sup>(37)</sup>.
- SVH: Es un tipo de BLEE frecuente, que deriva de SHV-1 y generan resistencia a cefalosporinas de tercera generación. Se caracteriza por la sustitución de serina a glicina en la posición 238, donde su residuo serina hidroliza la ceftazidima; mientras que en la sustitución de lisina a glutamato en la posición 240, el residuo de lisina hidroliza la cefotaxima <sup>(38)</sup>.

- CTX-M: Fue descubierto en el 2000 por Tzouveleakis; este gen tiene la capacidad de generar resistencia a cefuroxima, cefotaxima y cefepime <sup>(37)</sup>. Durante los últimos años, se ha visto su incremento en varios países, lo cual es alarmante <sup>(39)</sup>.
- OXA: Pertenecen a clase molecular D y grupo funcional 2d, y fueron identificadas mayormente en *Pseudomonas aeruginosa* <sup>(40)</sup>. Estos genes generan resistencia a oxacilina, cloxacilina, meticilina y aminopenicilinas <sup>(37)</sup>.

## MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS BETALACTÁMICOS

Son antibióticos bactericidas y actúan mediante dos mecanismos: inhibición de síntesis de la pared celular y autólisis bacteriana <sup>(41)</sup>.

La pared celular es una estructura bacteriana conformada principalmente por peptidoglucano, siendo este el componente principal en bacterias Gram positivas; mientras que en bacterias Gram negativas, la capa de peptidoglucano es delgada, y además, presentan una estructura denominada membrana externa compuesta por lípidos y proteínas.

El peptidoglucano está formado por el ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina los cuales se sitúan de forma alterna; y cadenas de aminoácidos. “El ácido murámico fija las cadenas tetrapépticas, las cuales se van a unir hasta formar una malla” <sup>(41)</sup>. En la última etapa de la síntesis de pared celular bacteriana, se necesita la acción de las enzimas transpeptidasas denominadas PBP (*Penicillin binding protein*), los cuales mediante el proceso de transpeptidación rompen los enlaces peptídicos de dos D-Alanina subterminales y a su vez unen las cadenas peptídicas adyacentes. La autolisina, una enzima autolítica controlada, también es fundamental en la formación del peptidoglucano, porque este va a permitir el agrandamiento del peptidoglucano mediante la abertura en puntos distintos para insertar otras unidades monoméricas <sup>(42)</sup>.

Los betalactámicos inhiben la síntesis del peptidoglucano de la pared celular bacteriana debido a que tienen un anillo betalactámico en su estructura, el cual es parecido a la cadena peptídica donde se une la enzima transpeptidasa, por ende, este antibiótico se une a estas enzimas mediante un enlace covalente irreversible y así evita la unión de las cadenas peptídicas adyacentes, mientras tanto las autolisinas siguen destruyendo los enlaces del peptidoglucano y fragmentando la pared celular. Este proceso genera aumento de iones y sales en el citoplasma, por lo que aumenta la presión osmótica bacteriana para finalmente destruirla. Además, las bacterias que no tienen autolisinas son resistentes a los betalactámicos, porque solo inhiben su crecimiento <sup>(41) (43)</sup>.

## ESPECTRO ANTIMICROBIANO

Los betalactámicos actúan en bacterias Gram positivas, Gram negativas y espiroquetas excepto en mycoplasmas y bacterias intracelulares. Pueden actuar en cocos y bacilos, en bacterias anaeróbicas y facultativas <sup>(43)</sup>.

- Inhibidores de betalactamasas: Se unen a las betalactamasas de forma irreversible, sin embargo, tienen baja potencia antimicrobiana contra bacilos Gram negativos no fermentadores con excepción del sulbactam. Estos inhibidores actúan junto a un betalactámico frente a microorganismos que han desarrollado resistencia a este antibiótico, restaurando su acción antimicrobiana <sup>(41)</sup>.
- Cefalosporinas: se clasifican por generaciones según su espectro de acción, las de primera generación actúan frente a cocos Gram positivos, mientras que el resto de las generaciones actúan preferentemente contra bacilos Gram negativos con algunas excepciones que actúan frente a ambos. “*Las cefalosporinas no tienen actividad frente a enterococos, estafilococos meticilino resistentes y Listeria monocytogenes*” <sup>(43)</sup>.

- Carbapenémicos: Tienen mayor espectro de acción y potencia que el resto de betalactámicos, sin embargo, son inactivas frente a estafilococos meticilino resistente, *Enterococcus* resistentes a vancomicina, algunas especies de *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas maltophilia* <sup>(41)</sup><sup>(43)</sup>.
- Aztreonam: Es el único monobactámico permitido para el uso clínico, actúa frente a bacterias Gram negativas, facultativas y aerobias, mientras que frente a bacterias Gram positivas y anaeróbicas, no tiene actividad antimicrobiana <sup>(41)</sup>.

## MECANISMOS DE RESISTENCIA A BETALACTÁMICOS

La resistencia a los antibióticos betalactámicos se puede dar por mecanismos causados por la producción cromosómica o transferencia mediante plásmidos y transposones.

1. La producción de las enzimas betalactamasas es el principal mecanismo de resistencia contra los betalactámicos que afectan mayormente a bacterias Gram negativas. “Estas enzimas hidrolizan el anillo betalactámico del antimicrobiano, y actúan rompiendo el enlace amídico del anillo betalactámico, previa unión al carboxilo” <sup>(43)</sup>, esto evita su unión a la PBP.
2. Las betalactamasas causadas por producción cromosómica son inducibles, porque su producción aumenta frente a la exposición de betalactámicos <sup>(41)</sup>.
3. Por la presencia de bombas de expulsión, algunos microorganismos presentan sistemas de bombeo de antibióticos, como la *Pseudomonas aeruginosa*, generando resistencia intrínseca a betalactámicos por expulsión de estos <sup>(43)</sup>.
4. La modificación de la diana en las PBP, las alteraciones en esta enzima generan modificación en la afinidad, evitándose la unión del antibiótico a la enzima y su actividad. Este mecanismo se da principalmente en Gram positivos <sup>(41)</sup><sup>(43)</sup>.

5. Alteración en la permeabilidad, las bacterias Gram negativas presentan una membrana externa que hace difícil el acceso de sustancias hidrofílicas, por lo que se necesita de poros para permitir el ingreso de los antibióticos y posteriormente se unan a la PBP. Las alteraciones en la expresión o alteración de poros también pueden provocar resistencia <sup>(41)</sup>.

## IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE BLEE

Para identificar a las BLEE existen varios métodos, pero la identificación fenotípica es el más empleado en la mayoría de centros de salud de nuestro país. Las pruebas para detectar BLEE fenotípicamente se pueden realizar mediante los métodos de disco difusión o microdilución, para estos dos métodos se requiere un inóculo estándar ajustado al 0,5 según la escala de McFarland y medio de cultivo de Muller Hinton o Caldo de Muller Hinton ajustado con cationes respectivamente.

Según el CLSI - 2018, para determinar la presencia de BLEE con pruebas fenotípicas en cepas de *E. coli* se puede realizar con el método de disco difusión y microdilución en caldo. Los antibióticos necesarios para la identificación de BLEE se encuentran en la tabla N° 1 y tabla N° 2.

**Tabla N° 1.** Método fenotípico por disco difusión para la determinación de BLEE, CLSI 2018

MÉTODO DE DISCO DIFUSIÓN			
PRUEBA DE TAMIZAJE		PRUEBA CONFIRMATORIA	
Antibiótico	(mm)	Antibiótico	(mm)
- Cefpodoxima	(10 µg)	- Cefotaxima	(30 µg)
- Ceftazidima	(30 µg)	- Cefotaxima +	
- Ceftriaxona	(30 µg)	Ácido Clavulánico	(30 µg /10 µg)
- Cefotaxima	(30 µg)	- Ceftazidima	(30 µg)
- Aztreonam	(30 µg)	- Ceftazidima +	
		Ácido clavulánico	(30 µg /10 µg)

(Fuente: Manual de actualización en Resistencia bacteriana y normas CLSI M100 S20, Bogotá, 2010 <sup>(44)</sup>; *Clinical and Laboratory Standards Institute*, CLSI- 2018- M100 - S28 <sup>(45)</sup>)

**Tabla N° 2.** Método fenotípico de microdilución en caldo para la determinación de BLEE, CLSI 2018

MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN CALDO			
PRUEBA DE TAMIZAJE		PRUEBA CONFIRMATORIA	
Antibiótico	[µg/mL]	Antibiótico	[µg/mL]
- Cefpodoxima	(4 µg/mL)	- Cefotaxima	(0,25-128 µg/mL)
- Ceftazidima	(1 µg/mL)	- Cefotaxima + Ácido clavulánico	
- Ceftriaxona	(1 µg/mL)	(0,25/4µg/mL - 128/4µg/mL)	
- Cefotaxima	(1 µg/mL)	- Ceftazidima	(0,25 -64 µg/mL)
- Aztreonam	(1 µg/mL)	- Ceftazidima + Ácido clavulánico	
		(0,25/4 µg/mL – 64/4 µg/mL).	

(Fuente: Manual de actualización en Resistencia bacteriana y normas CLSI M100 S20, Bogotá, 2010 <sup>(44)</sup>; *Clinical and Laboratory Standards Institute*, CLSI- 2018- M100 - S28 <sup>(45)</sup>)

Existen otros métodos alternativos para determinar BLEE, y una de ellas es la prueba alternativa doble disco de Jarlier. En este método, se debe colocar un disco de amoxicilina/ácido clavulánico (20/10 µg) en el centro de la placa de Muller Hinton y a una distancia de 20 mm se colocan los discos de ceftazidima (30 µg) y Cefotaxima (30 µg). La producción de BLEE se manifiesta con la ampliación de algún halo de inhibición de uno de los antibióticos <sup>(44)</sup>.



La Interpretación de la resistencia a betalactámicos según la CLSI - 2018 usando el método de disco difusión, se indica en la tabla N° 3 <sup>(45)</sup>.

**Tabla N° 3.** Punto de corte de betalactámicos - disco difusión, según CLSI 2018

<b>BETALACTÁMICOS</b>	<b>Sensible (S) (mm)</b>	<b>Intermedio (I) (mm)</b>	<b>Resistente (R) (mm)</b>
<b>Cefepime (30 µg)</b>	$S \geq 25$		$R \leq 18$
<b>Cefotaxima (30 µg)</b>	$S \geq 26$	$I = [23 - 25]$	$R \leq 22$
<b>Ceftriaxone (30 µg)</b>	$S \geq 23$	$I = [20 - 22]$	$R \leq 19$
<b>Cefoxitin (30 µg)</b>	$S \geq 18$	$I = [15 - 17]$	$R \leq 14$
<b>Cefuroxima (30 µg) (parenteral)</b>	$S \geq 18$	$I = [15 - 17]$	$R \leq 14$
<b>Ceftazidima (30µg)</b>	$S \geq 21$	$I = [18 - 20]$	$R \leq 17$
<b>Aztreonam (30 µg)</b>	$S \geq 21$	$I = [18 - 20]$	$R \leq 17$
<b>Amoxicilina – Clavulánico (20/10 µg)</b>	$S \geq 18$	$I = [14 - 17]$	$R \leq 13$
<b>Ampicilina – Sulbactam (10/10 µg)</b>	$S \geq 15$	$I = [12 - 14]$	$R \leq 11$
<b>Ertapenem (10 µg)</b>	$S \geq 22$	$I = [19 - 21]$	$R \leq 18$

(Fuente: *Clinical and Laboratory Standards Institute*, CLSI- 2018- M100 - S28 <sup>(45)</sup>)

## IDENTIFICACIÓN DE BLEE POR MÉTODO AUTOMATIZADO VITEK® 2 COMPACT

El VITEK® 2 Compact es un equipo automatizado empleado para la identificación bacteriana y su susceptibilidad antimicrobiana. La identificación bacteriana se realiza por el método de colorimetría, para lo cual se inocula una suspensión de bacterias a las tarjetas que contienen paneles con reacciones bioquímicas. Mientras tanto, la sensibilidad antimicrobiana se determina mediante el método de concentración mínima inhibitoria (MIC) y también es realizado en tarjetas, los cuales contienen diluciones estandarizadas con diferentes antibióticos y sus puntos de corte según la CLSI. Finalmente, el software del equipo los seleccionará como: Intermedio (I), resistentes (R) y sensibles (S), según el microorganismo aislado y su patrón de susceptibilidad <sup>(46)</sup>. Observar la tabla N° 4.

**Tabla N° 4.** Punto de corte de betalactámicos - CMI, según CLSI 2018.

BETALACTÁMICOS	Sensible (S) (µg/mL)	Intermedio (I) (µg/mL)	Resistente (R) (µg/mL)
Cefepime (30 µg)	$S \leq 2$	--	$R \geq 16$
Cefotaxima (30 µg)	$S \leq 1$	$I = 2$	$R \geq 4$
Ceftriaxone (30 µg)	$S \leq 1$	$I = 2$	$R \geq 4$
Cefoxitin (30 µg)	$S \leq 8$	$I = 16$	$R \geq 32$
Cefuroxima (30 µg) (parenteral)	$S \leq 8$	$I = 16$	$R \geq 32$
Ceftazidima (30µg)	$S \leq 4$	$I = 8$	$R \geq 16$
Aztreonam (30 µg)	$S \leq 4$	$I = 8$	$R \geq 16$
Amoxicilina – clavulánico (20/10 µg)	$S \leq 8/4$	$I = 16/8$	$R \geq 32/16$
Ampicilina – sulbactam (10/10 µg)	$S \leq 8/4$	$I = 16/8$	$R \geq 32/16$
Ertapenem (10 µg)	$S \leq 1,5$	$I = 1$	$R \geq 2$

(Fuente: *Clinical and Laboratory Standards Institute*, CLSI- 2018- M100 - S28 <sup>(45)</sup>)

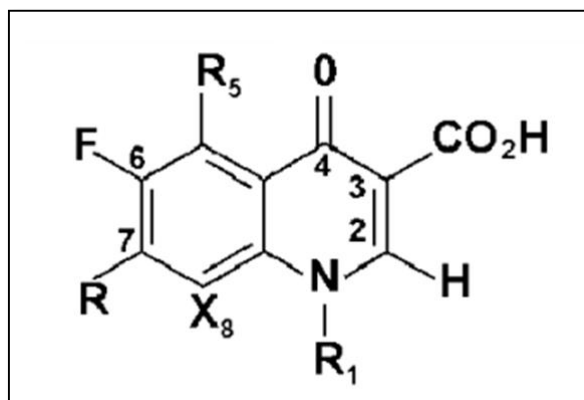
## QUINOLONAS

### DEFINICIÓN

Son antibióticos sintéticos bactericidas de amplio espectro antimicrobiano, actúan en bacterias Gram positivos y Gram negativos. Esta clase de antimicrobianos son utilizadas frecuentemente ante infecciones comunales y nosocomiales <sup>(47)</sup>, sin embargo, a partir de los años 90, se ha incrementado la resistencia a este antibiótico amenazando su uso clínico.

### ESTRUCTURA QUÍMICA

Presentan estructuras bicíclicas heteroaromáticas conformado por un núcleo piridona-β-ácido carboxílico y un anillo aromático <sup>(47)</sup>. Estos presentan como estructura básica al 4-oxo-1,4-dihidroquinolina el cual se le conoce como 4-quinolona, como se muestra en la figura N° 1 <sup>(48)</sup>. Sus radicales se encuentran relacionadas con propiedades microbiológicas, farmacocinética y tóxicas.



**Figura N° 1.** Estructura química básica de las quinolonas.  
(Fuente: Rev. Chil Infect, Mella et al., 2000 <sup>(49)</sup>)

En la posición 1, cuando el R1 es el ciclo-propil; presenta propiedades estéricas, espaciales y de interacción electrónica. Estos actúan sobre enterobacterias y *Pseudomonas*. Mientras que la presencia de un anillo bencénico mono o difluorado en esta posición, mejora las propiedades farmacocinéticas y aumenta la actividad sobre bacterias intracelulares y anaeróbias <sup>(49)</sup>.

En la posición del 3 y 4, se encuentran el ácido carboxílico y grupo ceto, respectivamente, estos permiten el transporte de las quinolonas al interior de la bacteria y su unión a las topoisomerasas bacterianas <sup>(49)</sup> <sup>(50)</sup>.

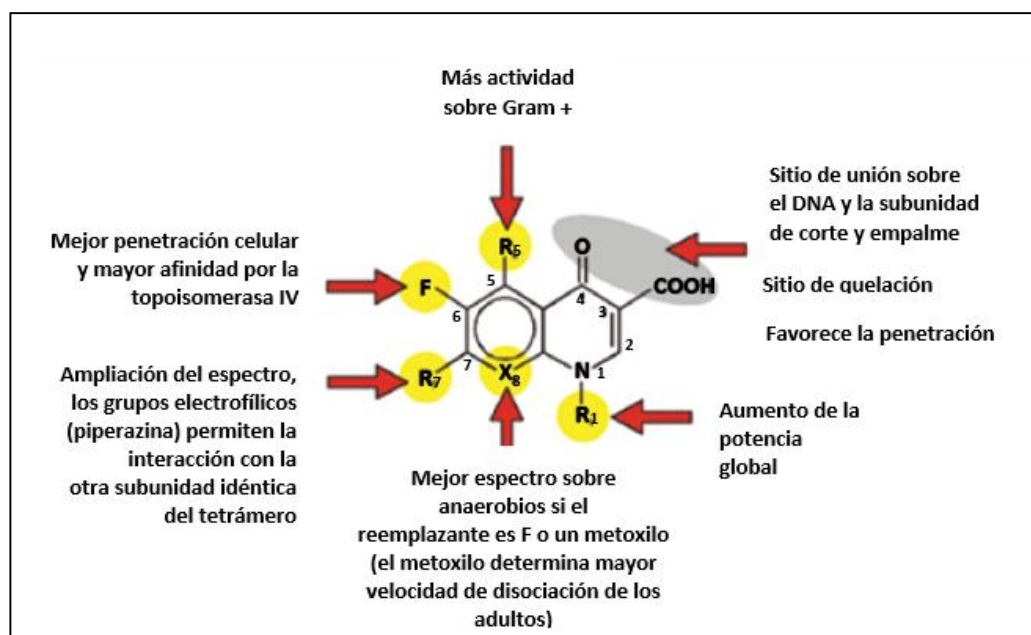
En la posición 5, la introducción de un grupo amino, hidroxilo o metilo incrementa la absorción, distribución y actividad en Gram positivos. La presencia de un grupo metilo mejora sus propiedades farmacocinética y aumenta su acción sobre *S. pneumoniae* <sup>(49)</sup> <sup>(50)</sup>.

En la posición 6, la presencia del flúor mejora la actividad y la potencia antimicrobiana frente a bacterias Gram negativas, ya que aumenta la unión al complejo topoisomerasa- ADN y la penetración intracelular <sup>(49)</sup> <sup>(51)</sup>.

En la posición 7, se encuentran los grupos químicos: piperazina, metilpiperazina (la presencia de un metilo en la C4 de la piperazina aumenta la actividad en Gram

positivas y disminuye en bacilos Gram negativos y *P. aeruginosa*), pirrolidina, aminopirrolidinas y derivados (aumenta actividad en Gram positivos como el *S. pneumoniae* y anaerobios), azetidina (presente mejor acción que ciprofloxacino sobre todo en Gram positivos) y azabicyclo (actúan en *S. pneumoniae* resistentes a penicilina, patógenos atípicos y anaerobios) <sup>(49)</sup>.

En la posición 8, la presencia de halógenos (F y el Cl) aumentan la actividad frente a anaerobios y también presentan mejor absorción por vía oral. Los halógenos en esta posición tienen mejor potencia y espectro de acción que quinolonas de última generación, sin embargo, están asociadas con la fototoxicidad. La presencia del metoxi, sin presencia de halógenos como la moxifloxacina, también presenta mejor potencia y espectro antibacteriano <sup>(47) (49)</sup>. Observar en la figura N° 2.



**Figura N° 2.** Composición química y acción antimicrobiana de las quinolonas.  
(Fuente: Serra et al, 2008 <sup>(56)</sup>)

## HISTORIA

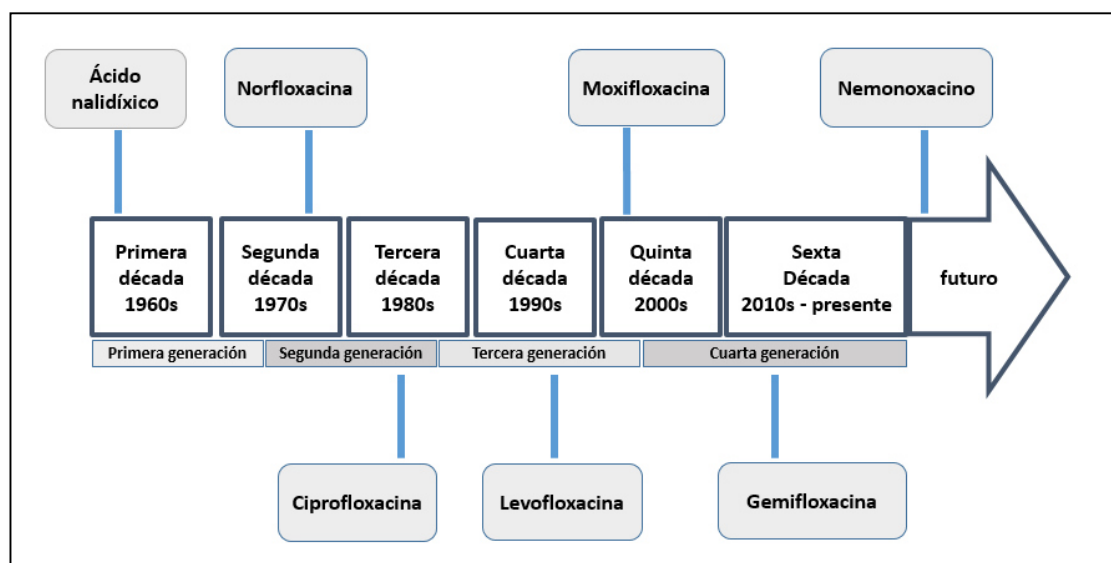
En la búsqueda de nuevos fármacos contra la malaria, en 1962 se genera el primera quinolona sintética, el ácido nalidíxico (1-etil-7-metil-4-oxo-1,8-naftiridina-3-ácido carboxílico), a partir del cual se comienza a generar nuevos antibióticos realizando cambios estructurales en la molécula <sup>(47)</sup>. El ácido nalidíxico es un antibiótico de baja absorción y distribución sistémica, pero que se ha encontrado en altas concentraciones en el tracto urinario, por el cual este tipo de antibióticos ha sido utilizado a este nivel. También se generaron otros antibióticos como cinoxacina y ácido oxacinólico, a los que se les denominó como quinolonas de primera generación <sup>(52)</sup>.

Durante los años 80, se desarrollaron las quinolonas de segunda generación, los cuales presentan un átomo de flúor y un grupo piperazina en la posición C6 y C7, respectivamente, por lo que se les denominó como fluoroquinolonas <sup>(53)</sup>. Este grupo se inicia con la introducción de la norfloxacin, un antibiótico que además de actuar ante las bacterias Gram negativos también tenía acción sobre las Gram positivas; pero con baja distribución sistémica, baja absorción digestiva y concentraciones bajas en la sangre, por lo que se realizaron modificaciones en su estructura generándose la ofloxacin, ciprofloxacina, enoxacin, lomefloxacina y otros, los cuales presentan amplio espectro antimicrobiano, buena distribución sistémica y biodisponibilidad oral <sup>(52)</sup>.

En los años 90, se desarrollaron las quinolonas de tercera generación como resultado del continuo cambio en las aminos del C7 de la fluoroquinolona, introduciendo grupos piperazina y aminopirrolidina, confiriéndole un amplio espectro de acción y mejor farmacocinética y farmacodinámica que las quinolonas anteriores <sup>(52) (54) (55)</sup>.

Las quinolonas de cuarta generación se generaron a fines de los últimos años noventa, para mejorar la eficacia de los fármacos. Realizaron cambios estructurales adicionando el ciclopropil y un grupo metoxi en la posición C1 y C8, respectivamente; sin embargo, se deben considerar sus limitaciones en su uso, por las reacciones adversas que pueden generar <sup>(54) (56) (57)</sup>.

Actualmente, algunos autores consideran a las quinolonas de quinta generación, siendo la delafloxacin el único fármaco perteneciente a este grupo <sup>(57)</sup>. Este antibiótico tiene dos mecanismos de acción: en el ADN girasa y Topoisomerasa IV, por lo que presenta amplio espectro de acción. Son efectivos, seguros y se han registrado bajas reacciones adversas por ello continúan en investigación para su uso en infecciones complicadas <sup>(58)</sup> <sup>(59)</sup>. Observar en la figura N° 3.



**Figura N° 3.** Cronología del desarrollo de las quinolonas.  
(Fuente: Scielo, Chávez – Jacobo V.M. et. al, 2015 <sup>(54)</sup>)

## CLASIFICACIÓN Y ESPECTRO DE ACCIÓN

Las nuevas quinolonas se generaron debido a las modificaciones en la estructura química del ácido nalidíxico. Estos se clasifican por generaciones según el orden cronológico, estructura química y su espectro de acción. Observar la tabla N° 5.

**TABLA N° 5.** Clasificación de las quinolonas y espectro de acción

CLASIFICACIÓN	QUINOLONAS	ESPECTRO DE ACCIÓN (*)
<b>Primera Generación</b>	Ácido nalidixico, ácido oxolínico, cinoxacino, pipemidico, piromidico, acroxacino, flumequina y roxosacino.	Actúan en bacilos Gram negativos: <i>E. coli</i> , <i>Proteus</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i> , <i>Shigella</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Salmonella</i> , con excepción de <i>Pseudomonas</i> spp. y otros no fermentadores <sup>(60)</sup> .
<b>Segunda Generación</b>	Norfloxacin, ciprofloxacino, ofloxacino, enofloxacino, lomefloxacino, nadifloxacino, pefloxacino y rufloxacino.	Actúan en bacterias Gram negativas, algunas Gram positivas ( <i>Staphylococcus aureus</i> ), <i>Pseudomonas</i> y algunas bacterias atípicas <sup>(56)</sup> <sup>(57)</sup> .
<b>Tercera Generación</b>	Levofloxacino, tosufloxacino, grepafloxacino, temafloxacino y esparfloxacino.	Actúan en bacterias Gram negativas, Gram positivas (además de las de segunda generación, actúan también contra <i>Streptococcus pneumoniae</i> sensibles y resistentes a la penicilina), anaerobios y bacterias atípicas <sup>(56)</sup> <sup>(57)</sup> .
<b>Cuarta Generación</b>	Moxifloxacino, balofloxacino, pazufloxacino, arenfloxacino, sitafloxacino, rovafloxacino, trovafloxacino, gatifloxacino y gemifloxacino.	“Actúan en bacterias Gram negativas, Gram positivas, anaerobios, bacterias atípicas e incluso en <i>Pseudomonas</i> ” <sup>(56)</sup> <sup>(57)</sup> .

(\*) Esta información puede variar, debido a los mecanismos de resistencia antimicrobiana.  
(Fuente: AFP, King et al, 2000. Rev chil infect, Álvarez, 2015 <sup>(56)</sup>)

## MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS QUINOLONAS

Para actuar, las quinolonas deben ser transportadas al interior de la célula bacteriana a una concentración efectiva. En bacterias Gram negativas, las quinolonas hidrofílicas ingresan por el canal de porinas, mientras que las hidrófobas lo hacen por difusión de

las membranas <sup>(61)</sup>. Estos antibióticos actúan en el ADN girasa (topoisomerasa II) y en la topoisomerasa IV inhibiendo su acción.

Las topoisomerasas son enzimas que actúan en los procesos de desenrollamiento y enrollamiento del ADN cromosómico para la síntesis del ADN bacteriano. El ADN girasa está compuesta por dos subunidades: subunidad A (*gyrA*) y subunidad B (*gyrB*); esta topoisomerasa actúa en los superenrollamientos negativos disminuyendo la tensión de torsión acumulada del ADN de bacterias. La topoisomerasa IV también posee dos subunidades: *parC* y *parE*, y actúa separando las hebras del ADN después de la replicación <sup>(53)</sup> <sup>(61)</sup>.

Las quinolonas que actúan en el ADN girasa tienen efectividad en bacterias Gram negativas, mediante su interacción con aminoácidos de la alfa hélice cercana a la tirosina del centro activo. Asimismo, las quinolonas que tienen como diana a la topoisomerasa IV tienen efectividad en bacterias Gram positivas, el cual va a impedir la separación de las dos hebras de ADN <sup>(51)</sup> <sup>(53)</sup>.

En el proceso de acción de las quinolonas, estas se unen al complejo enzima - ADN para formar un complejo ternario: quinolona - enzima - ADN bacteriano. La quinolona al unirse a la ADN girasa o topoisomerasa IV, provoca la inhibición de esta enzima impidiendo la replicación y transcripción; y terminar en muerte celular <sup>(48)</sup> <sup>(54)</sup> <sup>(62)</sup>.

## FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINÁMICA DE LAS QUINOLONAS

La respuesta antimicrobiana y eficacia clínica depende de la concentración del antibiótico y su acción antimicrobiana. Las quinolonas son antibióticos de fácil absorción oral, con biodisponibilidad de 50 al 100%. Son de baja afinidad a proteínas plasmáticas (20 - 40%), uniéndose mayormente a la albúmina. Sus valores máximos alcanzan de 1 a 2 horas y su tiempo de vida media en plasma es de 1,5 a 17 horas <sup>(60)</sup> <sup>(62)</sup>.



Sus valores en suero tras la administración por vía oral y endovenosa son muy parecidas, por lo que se recomienda para la terapia secuencial <sup>(62)</sup>. Las fluoroquinolonas tienen un volumen de distribución de 1-4 L/Kg, por lo que llegan a altas concentración intracelulares <sup>(63)</sup>. Su concentración es elevada en polimorfonucleares, macrófago, tejido pulmonar, tejido renal y prostático, líquido ascítico, leche materna, orina, bilis y materia fecal <sup>(61)</sup>.

En el metabolismo y excreción de las quinolonas ofloxacina, levofloxacin, lomefloxacin y gatifloxacin, presentan un metabolismo hepático menor al 10% y son eliminados por filtrado glomerular o secreción tubular; mientras que el ácido pipemídico, ciprofloxacino y norfloxacino son metabolizados en el hígado aproximadamente en un 20% y excretados por vía renal y biliar. El ácido nalidíxico, fleroxacin y la moxifloxacin son metabolizados en el hígado mayor al 35% y eliminados por vía biliar y por orina. Además, *“las quinolonas presentan efecto post antibiótico frente a pseudomonas, estafilococos, algunas enterobacterias”* <sup>(61)</sup>.

#### MECANISMO DE RESISTENCIA BACTERIANA A QUINOLONAS

La resistencia bacteriana a quinolonas se puede dar por diferentes mecanismos: cromosómico, pérdida de permeabilidad de membrana, alteración en las porinas y las bombas de transporte activo y mediante plásmido.

La resistencia cromosómica es la más frecuente y se debe a mutaciones o alteraciones en los genes que codifican la diana. La mutación en los genes de la ADN girasa (*gyrA* y *gyrB*) y la topoisomerasa IV (*parC* y *parE*) afectan el sitio activo, lugar donde se da la interacción enzima- ADN- quinolona <sup>(57)</sup> <sup>(62)</sup>.

La pérdida de permeabilidad de membrana se da por las mutaciones en los genes estructurales y regulares disminuyendo el número de porinas, *ompC* y *ompF* en *Escherichia coli* <sup>(64)</sup>.

Las mutaciones en los genes, que codifican las bombas de transporte activo, generan expresión y sobreexpresión de bombas de expulsión de las sustancias tóxicas para el microorganismo, provocando resistencia a varios antibióticos <sup>(62) (64)</sup>.

En los últimos estudios, se ha visto que la resistencia mediada por plásmidos, también es una vía para transferir resistencia a quinolonas. Dentro de este tipo de mecanismo de resistencia están las *qnr*, *aac(6')-Ib-cr* y las bombas de flujo codificadas por plásmido <sup>(54) (57)</sup>. El gen *qnr* es parte de la familia de pentapéptidos repetidos y se unen al complejo ADN - enzima evitando la unión de quinolonas a este complejo. El gen *aac(6')-Ib-cr* produce la enzima *aac(6')-Ib-cr* que acetila el nitrógeno del grupo piperazina en el C-7, reduciendo la afinidad de las quinolonas. En las bombas de flujo codificadas por plásmido, se han identificado los genes *oqxAB* y *qepA* <sup>(6) (57)</sup>.

## IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE RESISTENCIA A QUINOLONAS

La aparición de la resistencia a las quinolonas se da principalmente por mecanismos cromosómicos, donde el uso de quinolonas es el principal factor para que estos se seleccionen. También, se encuentran los determinantes plasmídicos de resistencia a quinolonas, pero este mecanismo no se puede identificar por marcadores fenotípicos, por lo que su detección es molecular. Sin embargo, en varios estudios se ha observado que en enterobacterias sensibles al ácido nalidíxico, la presencia de mecanismos plasmídicos disminuye la sensibilidad a fluoroquinolonas.

## INTERPRETACIÓN DE RESISTENCIA A QUINOLONAS

- Resistencia de alto nivel a ácido nalidíxico y sensibilidad a ciprofloxacino: Ácido nalidíxico ( $\text{CMI} \geq 32 \mu\text{g/mL}$ ) y ciprofloxacino ( $\text{CMI} \leq 1 \mu\text{g/mL}$ ). Pueden presentar la primera mutación en un QRDR, generalmente en la *gyrA*; sin embargo, con la aparición de otras mutaciones en este u otro QRDR, la cepa pasaría a ser resistente a fluoroquinolonas <sup>(45) (65) (66)</sup>.

- Resistencia al ácido nalidíxico de alto nivel y sensibilidad intermedia o resistencia a ciprofloxacino: Ácido nalidíxico (CMI  $\geq 32$   $\mu\text{g/mL}$ ) y ciprofloxacino (CMI  $\geq 2$   $\mu\text{g/mL}$ ). Los aislados con este fenotipo tienen alta probabilidad de presentar al menos 2 mutaciones en *gyrA* o *gyrA* y *parC*, lo que implicaría resistencia a todas las fluoroquinolonas <sup>(45)</sup> <sup>(65)</sup>.
- Sensibilidad disminuida al ácido nalidíxico y ciprofloxacino: Ácido nalidíxico (CMI 16-32  $\mu\text{g/mL}$ ) y ciprofloxacino (CMI 0,25-1  $\mu\text{g/mL}$ ), estos aislados tienen alta probabilidad de presentar mecanismos plasmídicos (PMQR), sin alteración en las topoisomerasas, conllevando a la disminución de sensibilidad a las fluoroquinolonas. Este fenotipo también se puede presentar por la disminución de permeabilidad de la membrana externa o hiperactividad de las bombas de expulsión, lo cual disminuye la concentración intracelular de antibiótico <sup>(45)</sup> <sup>(65)</sup>, ver el anexo 2.

La interpretación de la susceptibilidad a quinolonas con el método de disco difusión tiene las siguientes consideraciones según la CLSI 2018 <sup>(45)</sup>. Observar en la tabla N° 6.

**Tabla N° 6.** Punto de corte de quinolonas - disco difusión, Kirby Bauer, según la CLSI 2018

QUINOLONAS	Sensible (S)	Intermedio (I)	Resistente (R)
Ácido nalidixico (30 $\mu\text{g}$ )	$S \geq 19\text{mm}$	$I = [14 - 18]\text{mm}$	$R \leq 13\text{mm}$
ciprofloxacino (5 $\mu\text{g}$ )	$S \geq 21\text{mm}$	$I = [16 - 20]\text{mm}$	$R \leq 15\text{mm}$
Norfloxacin (10 $\mu\text{g}$ )	$S \geq 17\text{mm}$	$I = [13 - 16]\text{mm}$	$R \leq 12\text{mm}$
Ofloxacin (5 $\mu\text{g}$ )	$S \geq 16\text{mm}$	$I = [13 - 15]\text{mm}$	$R \leq 12\text{mm}$
Levofloxacin (5 $\mu\text{g}$ )	$S \geq 17\text{mm}$	$I = [14 - 16]\text{mm}$	$R \leq 13\text{mm}$
Gemifloxacin (5 $\mu\text{g}$ )	$S \geq 20\text{mm}$	$I = [16 - 19]\text{mm}$	$R \leq 15\text{mm}$
Gatifloxacin (5 $\mu\text{g}$ )	$S \geq 18\text{mm}$	$I = [15 - 17]\text{mm}$	$R \leq 14\text{mm}$

(Fuente: *Clinical and Laboratory Standards Institute*, CLSI- 2018- M100 - S28 <sup>(45)</sup>)

## RESISTENCIA PLASMÍDICA A QUINOLONAS Y EL GEN *qnr*

En 1998, M. Martínez et al. descubren el gen *qnr* y explican por primera vez que la resistencia bacteriana frente a quinolonas, también puede ser transferida horizontalmente mediante plásmidos <sup>(64)</sup>. El *qnr* es un gen plasmídico bacteriano responsable de la disminución de sensibilidad a quinolonas y de la predisposición a la resistencia bacteriana de este antibiótico. En estudios anteriores se demuestra la presencia de genes PMQR en plásmidos, donde los genes *qnr* están asociados a elementos genéticos móviles o transponibles (ISCR1, IS26 y otros). El gen *qnr* aún no tiene un origen definido, sin embargo, estudios afirman que el gen *qnrA* ha sido encontrado un alga del género *Shewanella* en altas concentraciones, por lo que se supuso que podría ser un reservorio de este gen. También, se ha identificado el gen *qnrA* en especies marinas, lo cual hizo pensar que su reservorio tenía que ver con el agua dulce <sup>(67)</sup>.

Primero, se descubrió el *qnrA*; más tarde, el *qnrS*; seguido del *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* y últimamente el *qnrVC*; sin embargo, el gen *qnrB* ya existía años antes que se usaran las quinolonas, esto se demostró en un estudio donde estos genes fueron identificados en cepas de *Citrobacter freundii* aisladas en 1930 <sup>(68)</sup>. Se han descrito 78 alelos para *qnrB*, mientras que en el resto son inferiores a 10, además el *qnrB* y *qnrA* comparten 39,5% de aminoácidos y con *qnrS* 37,4% de aminoácidos. Otro estudio demuestra que el gen PMQR más frecuente es el *qnrB*, el cual fue detectado en un 83% de los aislamientos y, dentro de este grupo, el gen *qnrB19* era el más común seguida del *qnrB10* <sup>(5)</sup>.

### FUNCIÓN DEL GEN *qnr*

El *qnrB*, al igual que los otros genes *qnr*, ha demostrado que sirven para proteger el ADN girasa de las quinolonas generando resistencia a este antibiótico a través de dos mecanismos: la disminución del número de diana enzimática en el cromosoma y su unión a las topoisomerasas evitando el ingreso de quinolonas <sup>(69)</sup>. El gen plasmídico *qnr* confiere resistencia de bajo nivel, sin embargo, facilita la producción de

mecanismos de alto nivel de resistencia, volviendo a las cepas resistentes a quinolonas. Además, algunos estudios afirman que a elevadas concentraciones de *qnr*, estas pueden inhibir a las quinolonas <sup>(70)</sup>.

## **PRESENCIA DE *qnr* Y SU RELACIÓN CON LA RESISTENCIA A QUINOLONAS Y BETALACTAMASAS**

El gen *qnr* fue descubierto cuando se realizaba estudios de resistencia a betalactamasas producidas por plásmidos multirresistentes de *K. pneumoniae* carente de porinas, en el cual se incrementó el nivel resistencia a ciprofloxacino de 4 a 32 µg/mL tras adquirir el plásmido <sup>(68)</sup>.

En un estudio realizado en China, se observó que los genes de PMQR estaban relacionados con BLEE, esto se debe a que los genes PMQR y BLEE son controlados por el mismo promotor <sup>(71)</sup>. La producción de BLEE con resistencia a quinolonas ha sido observada en estudios anteriores, como en EE. UU. y en la India, donde se identificó al gen *qnrB* junto a los genes *bla*<sub>CTX-M-15</sub> y *bla*<sub>SHV-12</sub> dentro del mismo plásmido bacteriano <sup>(70)</sup>.

El *qnr* es un gen que confiere baja resistencia a quinolonas; sin embargo, no es menos importante que los otros mecanismos de resistencia, ya que al estar en concentraciones elevadas puede causar resistencia a quinolonas; además estos facilitan la selección de niveles de mayor resistencia por la aparición de mutaciones secundarias <sup>(70)</sup>.

La corresponsencia a antimicrobianos es un problema de actualidad a nivel mundial, debido a que un microorganismo puede presentar varios plásmidos. Esto se debe a que existen elementos que movilizan los genes plásmídicos como: el ISCR1, cuya secuencia está asociada con los integrones de clase 1. El ISCR1 cumple una función importante de movilizar y transferir los genes de resistencia como el *qnr*, *bla*, *aac(6')-Ib-cr* y otros. En un estudio realizado en Taiwán, se encontró la presencia de ISCR1 en 13 de 20 aislamientos, de los cuales en 11 aislamientos se encontraron la

combinación de genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>DHA-1</sub>, *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, y *armA*, confirmando la co-existencia de genes plasmídicos bacterianos <sup>(17)</sup>.

## **DETECCIÓN MOLECULAR DEL *qnr***

### **REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN, copiándolos fielmente durante varios ciclos repetidos. Fue desarrollada por Kary B. Mullis en 1985, para el estudio de los ácidos nucleicos, a partir del cual, revolucionó para estudiar y manipular mejor el ADN <sup>(72)</sup> <sup>(73)</sup>.

Hoy en día, la PCR es considerada como una técnica de alta sensibilidad, reproducibilidad y eficiencia que puede utilizarse en áreas de ciencia biológicas y salud <sup>(72)</sup>.

La PCR se realiza en tres etapas principales: desnaturalización, hibridación y extensión. Para el desarrollo de esta técnica se necesita de los siguientes elementos: enzima ADN polimerasa, la más usada es la *Taq* ADN polimerasa de la bacteria termófila, *Thermus aquaticus*; el ADN bacteriano de aislados clínicos y controles; *primers* (*forward* y *reverse*); desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTP's), bases nitrogenadas para construir las nuevas cadenas de ADN; ion magnesio ( $Mg^{2+}$ ), cofactor enzimático que influye para la especificidad de la reacción; solución amortiguadora o buffer, compuesta por Tris-HCl (pH=8) con una concentración final de 1X y H<sub>2</sub>O PCR, libre de nucleasas <sup>(72)</sup> <sup>(74)</sup>.

Al finalizar la PCR, se realiza la electroforesis para analizar el producto que se obtuvo tras la amplificación. En este proceso los amplicones son corridos en gel de agarosa (1,2% -2%) junto al marcador molecular (*Ladder*), el cual contiene un número determinado de segmentos de ADN con pares de base conocidos. Los amplicones

migran hacia el polo positivo porque tienen carga negativa y se separan según su peso y carga molecular <sup>(72)</sup>.

“Para visualizar los amplicones en la electroforesis se utiliza el bromuro de etidio, un colorante que al ser expuesto a luz ultravioleta, emitirá una luz anaranjada, sin embargo, esta sustancia es un agente mutagénico y tóxico para el hombre” <sup>(75)</sup>. El SYBR Safe<sup>®</sup>, es una tinción verde fluorescente que se utiliza en reemplazo del bromuro de etidio, el cual se une a la doble cadena de ADN, manifestándose en forma de bandas <sup>(76)</sup> <sup>(77)</sup>. Además, existen otras opciones de tinciones como: BioRad - Bio-Safe ADN Stain, Ward's-QUIKView ADN Stain, etc. La visualización se realiza en una foto digital del gel de agarosa expuesto a transiluminador y el análisis de bandas se realiza mediante el procesador de imágenes <sup>(72)</sup>.

#### DETECCIÓN DEL GEN *qnrB* POR PCR CONVENCIONAL

La identificación de los genes *qnrB* se realizan mediante la PCR, un método sensible, específico y rápido. La PCR es una reacción enzimática la cual va a producir amplicones de una secuencia específica de ADN.

Para la realización de la PCR se necesita del termociclador y de la preparación de un master mix para cada cepa, el cual va a contener Buffer 10x, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, *Taq* ADN polimerasa, H<sub>2</sub>O PCR, ADN molde y los *primers* o cebadores.

Los primers *qnrB* diseñados por Cattoir et al. son utilizados con mayor frecuencia para investigaciones, porque se han obtenido buenos resultados <sup>(78)</sup>. Observar la tabla N° 7.

**Tabla N° 7.** Cebadores (*Primers*) utilizados para determinar el gen *qnrB*

<i>Primer</i>	Secuencia 5' -> 3'	Posición	Tamaño del producto amplificado por PCR (pb)
<b><i>QnrBm- F</i></b>	GGMATHGAAATTCGCCACTG	283-302	264
<b><i>QnrBm- R</i></b>	TTTGCYGYCGCCAGTCGAA	526-545	

(Fuente: Cattoir et al., 2007 <sup>(78)</sup>)

Luego de obtener los amplicones de ADN, se realiza la corrida de electroforesis en gel de agarosa y, para visualizar las bandas se han encontrado nuevas alternativas de colorantes como el SYBR Safe® para evitar el uso del bromuro de etidio por ser mutagénico <sup>(76)(78)</sup>.

#### 1.4.2. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

- **Fluoroquinolona:** Es un grupo de agentes antimicrobianos sintéticos que a diferencia de las demás quinolonas, estas tienen un átomo de flúor en C-6 y un anillo de piperazina en C-7 que les confiere mejor potencia y farmacocinética. Son antibióticos bactericidas que actúan frente a bacterias Gram negativas y algunas Gram positivas <sup>(62)</sup>.
- **Resistencia antimicrobiana:** Es el cambio que se producen en los microorganismos haciendo ineficaces a los medicamentos que se usan para tratar las infecciones <sup>(79)</sup>.
- **Resistencia a los antibióticos:** Cambio producido por mutación o adquisición de un gen en las bacterias que provocan que los antibióticos sean ineficaces <sup>(79)</sup>.
- **Antibióticos:** Son sustancias naturales, sintéticas o semi-sintéticas que tienen la capacidad de inducir la muerte o inhibir el crecimiento bacteriano <sup>(80)</sup>.
- **Topoisomerasas:** Son enzimas encargadas del enrollamiento y desenrollamiento durante la transcripción y traducción del ADN, realizando cortes en las hebras para disminuir la torsión formada. Son responsables de la topología del ADN <sup>(61)</sup>.



- **ADN girasa:** También denominada topoisomerasa II; realiza un corte de doble cadena en la replicación del ADN para reducir la tensión molecular causada por el superenrollamiento <sup>(61)</sup>.
- **Porinas:** Son canales compuestos de proteínas que se encuentran en la membrana celular para permitir el paso de sustancias de bajo peso molecular. Se encuentran mayormente en la membrana externa de las bacterias Gram negativas <sup>(81)</sup>.
- **Plásmido:** Es una molécula de ADN circular. Estos confieren resistencia bacteriana frente a los antimicrobianos y se replican independientemente del cromosoma, desde una célula bacteriana dadora a otra receptora <sup>(82)</sup>.
- **Biodisponibilidad:** Es la cantidad y velocidad con la que un fármaco llega a la circulación y al lugar de acción manteniendo su concentración administrada para ser absorbida <sup>(83) (84)</sup>.
- **Betalactamasas:** Es una enzima producida por algunas bacterias que actúan inactivando a los antibióticos betalactámicos, debido a que estas enzimas rompen el anillo betalactámico, impidiendo la unión de los antibióticos a las transpeptidasas <sup>(33)</sup>.
- **Oximinocefalosporinas:** Es un grupo de antimicrobianos en los que se encuentra a la cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima y cefepima. Son importantes para la detección fenotípica de enzimas betalactamasas de espectro extendido <sup>(65)</sup>.
- **Promotor:** Es una secuencia de ADN y está localizada en el punto de inicio de la transcripción, por lo que promueve la transcripción de un gen <sup>(85)</sup>.
- **Integrón:** Es un elemento genético que tiene la capacidad de integrar, expresar y transportar genes de resistencia a los antimicrobianos mediante la expresión de una proteína que les permite capturar y liberar el IS (inserted sequences), un elemento móvil intragenómico, en el cual se incluyen los genes de resistencia <sup>(86)</sup>.

- **Transposón:** Es una secuencia de ADN que tiene la capacidad de moverse en diferentes partes de un genoma generando cambios en el ADN, a este fenómeno se le conoce como transposición y es llevada a cabo por la proteína denominada transposasa <sup>(87)</sup>.
- **Bajo nivel de resistencia bacteriana a quinolonas:** Son mecanismos que contribuyen con la resistencia bacteriana disminuyendo el CMI y/o el halo de sensibilidad de las quinolonas, sin manifestar el fenotipo de resistencia <sup>(70)</sup> <sup>(88)</sup>.
- **Multidrogo resistente (MDR):** También denominada como multirresistente, es una categoría donde los microorganismos son resistentes a 3 o más grupos de antibióticos <sup>(89)</sup>.
- **Farmacocinética:** Es el estudio de las concentraciones de un fármaco en su proceso de absorción, distribución y eliminación <sup>(90)</sup>.
- **Farmacodinámica:** Estudia la actividad de los fármacos en los organismos y su eficacia terapéutica <sup>(90)</sup>.
- **Microbiota:** Es un conjunto de microorganismos que viven en nuestro cuerpo como mutualistas, comensales y/o patógenos <sup>(91)</sup>.
- **Shock térmico:** Es un método de extracción de ADN bacteriano total sencillo y de bajo costo. El ADN se obtiene mediante la lisis por ebullición y su posterior centrifugación <sup>(92)</sup>.

#### 1.4.3. FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS

La frecuencia del gen *qnrB* se encuentra mayor al 30% de aislados de *Escherichia coli* productoras de BLEE, y la susceptibilidad a quinolonas es de perfil resistente en el 70%.

## **CAPÍTULO II: MÉTODOS**

## 2.1. DISEÑO METODOLÓGICO

### 2.1.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN

Estudio tipo cuantitativo.

### 2.1.2. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Estudio prospectivo, observacional, descriptivo, transversal.

### 2.1.3. POBLACIÓN

La población de estudio son *Escherichia coli* productoras de BLEE obtenidas en el laboratorio de microbiología del HONADOMANI “San Bartolomé”, aisladas de urocultivos en el periodo junio - agosto del 2018.

### 2.1.4. MUESTRA Y MUESTREO

El presente estudio pretende reportar la cifra real de la presencia del gen *qnrB* en aislados de *Escherichia coli* productoras de BLEE. Por lo tanto, se usaron todos los aislados de *Escherichia coli* productoras de BLEE de muestras de orina de pacientes atendidos en el servicio de microbiología del HONADOMANI “San Bartolomé”, dentro del periodo de estudio, que corresponde desde la 23° a la 35° semana epidemiológica del Perú.

#### 2.1.4.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Todos los aislados de *E. coli* BLEE positivo obtenidos en el laboratorio de microbiología del HONADOMANI “San Bartolomé” entre el 01 de junio y 31 de agosto del 2018.
- Las *E. coli* productoras de BLEE aisladas de muestras de orina.
- Aislamientos con reporte de resultados emitidos por el hospital de HONADOMANI “San Bartolomé”.

#### 2.1.4.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Aislamientos de *E. coli* productoras de BLEE con reporte diferente al registro de resultados.
- Aislados obtenidos de cultivos contaminados.

#### 2.1.5. VARIABLES

Las variables del estudio son: frecuencia del gen *qnrB* y perfil de susceptibilidad a quinolonas.

#### 2.1.6. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.

##### TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Se utilizaron fichas de recolección de aislados de *Escherichia coli* productoras de BLEE, para obtener datos de la identificación bacteriana, antibiograma y otros, los cuales fueron aprobadas y validadas por jueces expertos, observar en el anexo 7.

##### INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Se utilizaron las siguientes fichas, realizadas con Microsoft Excel 13:

- Ficha de registro de urocultivos y aislamientos de *Escherichia coli* en HONADOMANI “San Bartolomé”, observar en el anexo 3.
- Ficha de recolección de aislamientos de *Escherichia coli* productoras de BLEE, observar en el anexo 4.

### 2.1.7. PROCEDIMIENTOS Y ANÁLISIS DE DATOS:

#### PROCEDIMIENTOS

##### PLAN DE PROCEDIMIENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

En primer lugar, se obtuvo el permiso del Jefe del Laboratorio de microbiología y la aprobación de la oficina de Docencia e Investigación del Hospital Nacional Docente Madre Niño “San Bartolomé” (HONADOMANI “San Bartolomé”) con Exp. N°0268-19, para obtener los aislados de *Escherichia coli* productoras de BLEE de las muestras de orina de los pacientes, y para trasladarlas al Instituto de Medicina Tropical Daniel Alcides Carrión, de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos donde fueron procesadas.

Se obtuvo el permiso de la Dra. Bejar Castillo Vilma Ruth, Directora del Instituto de Medicina tropical Daniel Alcides Carrión y de la Dra. Hilda Solis Acosta, Directora del Departamento de Microbiología Médica de la UNMSM, para realizar los cultivos y antibiogramas. También se obtuvieron los permisos del Dr. Jorge Alarcón Villverde, Director del Centro de Investigaciones Tecnológicas, Biomédicas y Medioambientales (CITBM) y de la Mg. Milagros Zavaleta y Apestegui, Coordinadora de Investigación de Biotecnología y Salud de CITBM, para realizar el procedimiento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

##### RECOLECCIÓN DE AISLADOS DE *Escherichia coli* PRODUCTORAS DE BLEE

Las *Escherichia coli* productoras de BLEE se obtuvieron a partir de los aislamientos de muestras de orina realizados en el laboratorio de microbiología del hospital HONADOMANI “San Bartolomé”, los cuales ya han sido identificados mediante el sistema automatizado VITEK® 2 Compact o manual con el método de disco difusión.

Se colocó una asada de la colonia aislada de *Escherichia coli* productoras de BLEE, en un criovial estéril con 1,5 mL de agar tripticasa soya (TSA). Los aislados en crioviales fueron colocados en criobox a temperatura ambiente, posteriormente fueron trasladados al Instituto de Medicina Tropical Daniel Alcides Carrión de la UNMSM.

#### CONSERVACIÓN DE LOS AISLADOS DE *Escherichia coli* PRODUCTORAS DE BLEE

La preservación de los aislados de *Escherichia coli* productoras de BLEE se realizó en crioviales con caldo tripticasa soya (CTS) y glicerol al 20% y se conservaron a -80 °C.

#### IDENTIFICACIÓN BACTERIANA Y SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

En el Instituto de Medicina Tropical Daniel Alcides Carrión, los aislados de *Escherichia coli* productores de BLEE, fueron sembrados por segunda vez en CHROMagar™ para confirmar su identificación emitida por el HONADOMANI “San Bartolomé” y verificar su pureza; luego, se realizó la prueba de susceptibilidad antimicrobiana para confirmar la presencia de BLEE y la susceptibilidad antibacteriana a quinolonas. Se utilizaron discos de antibióticos para la detección de BLEE (ceftazidima, cefotaxima, amoxicilina con ácido clavulánico, cefepime, aztreonam, cefoxitina y ertapenem) y susceptibilidad bacteriana a quinolonas (ácido nalidíxico, cinoxacino, ciprofloxacino, norfloxacino, ofloxacino, lomefloxacino, fleroxacino, levofloxacino y gemifloxacino) <sup>(65)</sup>.

La interpretación de resistencia bacteriana se realizó según la CLSI 2018 mediante la medición de halos de inhibición y se clasificaron como sensibles, intermedio o resistentes, ver anexo N° 2.

## REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La determinación del gen *qnrB* fue realizada por el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La extracción del ADN bacteriano se realizó con la técnica de shock térmico y luego se almacenaron en crioviales, tal como se muestra en el anexo 1. Los *primers* que se utilizaron en este estudio son los siguientes: *QnrBm-F*: GGMATHGAAATTCGCCAATG y *QnrBm-R*: TTTGCYGYGCGCCAGTCGAA (78). Para realizar la PCR se preparó la Master mix: buffer (1x), MgCl<sub>2</sub> (1mM), dNTPs (0.4mM), *Taq* ADN polimerasa (1 unidad), H<sub>2</sub>O PCR, el ADN molde y los *primers* (0,5μM).

La amplificación del ADN se realizó en el termociclador de marca T100<sup>TM</sup> BioRad del Grupo de Investigación Resistencia a los antimicrobianos “MICRESIS” del VRIP-UNMSM, según las condiciones establecidas en el protocolo que se encuentra en el anexo 1.

Para evaluar la calidad del ADN se consideraron los siguientes criterios:

- La pureza de las colonias aisladas.
- Colonias frescas en su mayor fase de crecimiento (24 horas).
- Se consideró el índice de pureza de ADN de 1.5 de la relación de 260nm/280nm obtenidos por el NanoDrop<sup>TM</sup>.

Para identificar la presencia del gen *qnrB*, se realizó la electroforesis en gel de agarosa, luego se fotografiaron con un transiluminador para analizar las bandas según su peso molecular. Los resultados obtenidos se registraron en la ficha del anexo 5.



## ANÁLISIS DE DATOS

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa de STATA 14, el cual determina el nivel de significancia de la prueba de  $\chi^2$  ( $p=0,05$ ); y se empleó MICROSOFT OFFICE EXCEL 2013 para determinar la frecuencia de las variables cualitativas.

### 2.1.8. CONSIDERACIONES ÉTICAS.

Para realizar el presente trabajo, se obtuvo el permiso de la oficina de Docencia e Investigación del HONADOMANI “San Bartolomé” y del Jefe del Laboratorio de Microbiología para la recolección y traslado de los aislados bacterianos, con la aprobación del comité de ética institucional e investigación del hospital con Exp. N°0268-19.

Los aislados bacterianos fueron recolectados de medios de cultivos procesados en el laboratorio de microbiología del HONADOMANI “San Bartolomé”. No se utilizaron los nombres ni la historia clínica de los pacientes por lo cual no se necesitó el consentimiento informado. Este trabajo cumple con lo estipulado en la pauta 11 del CIOMS-2016 <sup>(93)</sup>.

## **CAPÍTULO III: RESULTADOS**

### 3. RESULTADOS

Durante el periodo de estudio, se registraron 487 urocultivos positivos, de los cuales se identificó como *Escherichia coli* a 337 aislados. Por el método automatizado (VITEK® 2 Compact) se realizó la prueba de susceptibilidad a antimicrobianos detectándose la presencia de betalactamasas de espectro extendido en 109 aislados (32,34%), siendo 93 de procedencia ambulatoria y 16 de procedencia hospitalaria.

Del total de aislados recolectados, se excluyeron del estudio 19 aislados debido a que no se identificaron como *Escherichia coli*, por presencia de contaminación o porque no hubo crecimiento bacteriano. Para verificar la producción de BLEE se realizó el método manual de disco difusión (método de Jarlier) y se obtuvo que 8 aislados de *Escherichia coli* no eran productoras de BLEE, los cuales también fueron excluidos del estudio. En total se confirmaron 82 aislados de *Escherichia coli* productoras de BLEE.

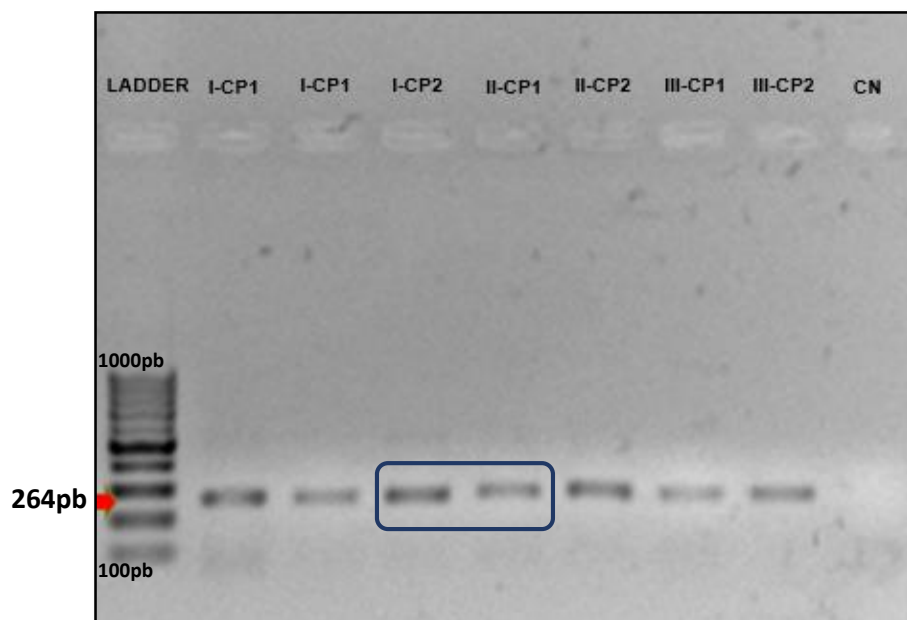
#### REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

En este estudio se realizó la PCR convencional para obtener los amplicones. En la preparación del master mix, se optimizaron las concentraciones del *primers* y MgCl<sub>2</sub> utilizando controles positivo y negativo.

##### **Optimización de la concentración de los *primers***

Se utilizaron los protocolos de Toribio et al. y Cattor et al. <sup>(11)</sup> <sup>(78)</sup> modificando la concentración de los *primers*.

Se utilizó el *primer* con diferentes concentraciones: 0,2 µM; 0,4 µM y 0,6 µM. Se hicieron uso de dos controles positivo (control positivo 1, control positivo 2) y un control negativo. En todos los casos se manifestaron bandas de forma clara y nítida de los controles positivos y ausentes en el control negativo, por lo cual se optó por trabajar con *primers* de 0,2 µM. Observar la fotografía N° 1.



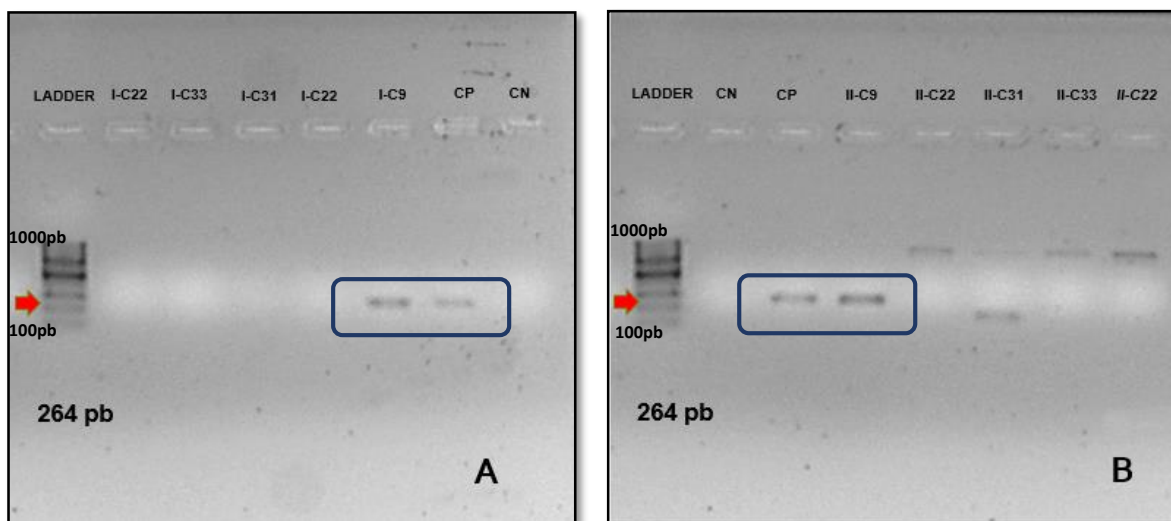
**Fotografía N° 1. Electroforesis de la optimización de concentración de los primers *qnrB* (264 pb).** Marcador de tamaño molecular 100pb ADN Ladder Invitrogen™. **Primers I (0,4 µM):** carril I-CP1, I-CP2. **Primers II (0,2 µM):** carril II-CP1, II-CP2. **Primers III (0,6 µM):** carril III-CP1, III-CP2. CP1: Control positivo 1. CP2. Control positivo 2. CN. Control negativo

Fuente: Elaboración propia

### Optimización de la concentración del MgCl<sub>2</sub>

Se utilizaron los protocolos de Toribio et al. y Cattor et al. <sup>(11)</sup> <sup>(78)</sup> y se modificó la concentración de MgCl<sub>2</sub>.

Durante el proceso se visualizaron bandas inespecíficas, que fueron eliminadas optimizando las concentraciones de MgCl<sub>2</sub> (1mM y 2mM). En A, se muestran los resultados obtenidos utilizando el MgCl<sub>2</sub> a 1mM, donde solo se observan las bandas en el control positivo (CP) y en una muestra positiva (I-C9); mientras que en B, la concentración del MgCl<sub>2</sub> fue de 2 mM, obteniéndose bandas inespecíficas, tal como se muestra en la fotografía N° 2. En el presente estudio se optó por utilizar el MgCl<sub>2</sub> a 1mM para evitar bandas inespecíficas en la electroforesis.

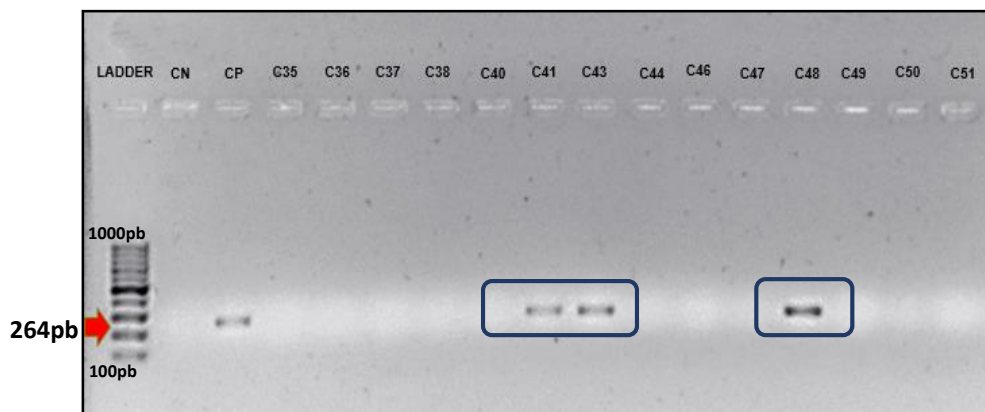


**Fotografía N° 2. Electroforesis de optimización de la concentración del  $MgCl_2$ .** Marcador de tamaño molecular 100pb ADN Ladder Invitrogen™. **A.**  $MgCl_2$  1mM. Carril CP: control positivo para el gen *qnrB* (264pb). Carril CN: control negativo, ausencia del gen *qnrB*. Carril I-C22, I-C31, I-C33 son aislamientos negativos. Carril I-C9 es un aislamiento positivo. **B.**  $MgCl_2$  2mM. Carril CP: control positivo. Carril CN: control negativo. Carril II-C22, II-C31, II-C33 son aislamientos negativos. Carril II-C9 es un aislamiento positivo.

Fuente: Elaboración propia

### PCR optimizado para la detección de *qnrB*

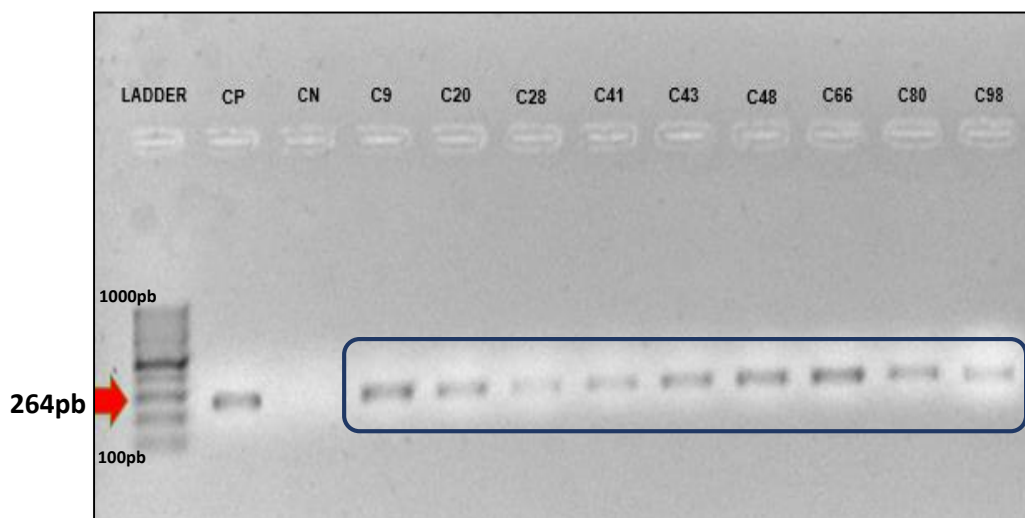
Después de la optimización del *primers* y  $MgCl_2$ , los aislados de *Escherichia coli* productoras de BLEE de nuestro estudio fueron procesadas utilizando el *primer* a 0,2  $\mu M$ ,  $MgCl_2$  a 1 mM, dNTP (0,4 mM), Buffer (X) y *Taq* ADN polimerasa (1 U/ $\mu L$ ). Ver fotografía N° 3.



**Fotografía N° 3. Electroforesis del gen *qnrB* de los aislamientos de *Escherichia coli* productoras de BLEE.** *Primers qnrB* (264 pb). Marcador de tamaño molecular: 100 pb ADN Ladder Invitrogen™. Carril CP: control positivo. Carril CN: control negativo. Carril C35, C36, C37, C38, C44, C46, C49, C50 y C51 son aislamientos negativos. Carril C41, C43 y C48 son aislamientos positivos.  
Fuente: Elaboración propia

### PCR de los aislados de *Escherichia coli* productoras de BLEE

En los resultados de la PCR, del total de 82 aislados de *Escherichia coli* productoras de BLEE, el 10,9% (9/82) presentó el gen *qnrB* para las cepas C9, C20, C28, C41, C43, C48, C66, C80 y C98, como se muestra en la electroforesis de la fotografía N° 4.

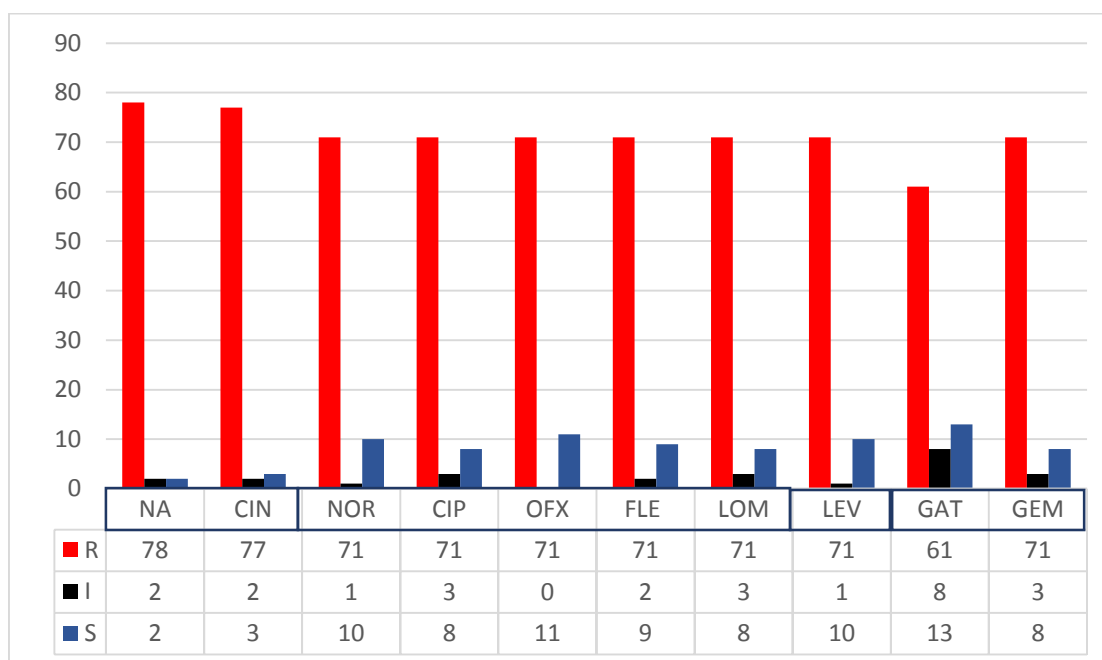


**Fotografía N° 4. Electroforesis de los aislados de *Escherichia coli* productoras de BLEE con presencia del gen *qnrB*.** *Primers qnrB* (264pb). Marcador de tamaño molecular: 100pb ADN Ladder Invitrogen™. Carril CP: control positivo. Carril CN: control negativo. Carril C9, C20, C28, C41, C43, C48, C66, C80 y C98 son aislamientos positivos.  
Fuente: Elaboración propia

## PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD A QUINOLONAS

De las 82 *Escherichia coli* productoras de BLEE recolectadas para este estudio, el 74,39% presentó resistencia a todas las quinolonas. Revelando el elevado porcentaje de resistencia a este antibiótico.

En las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana a quinolonas, la resistencia a ácido nalidíxico es del 95,1% (78/82); a cinoxacino es del 93,9% (77/82) y a gatifloxacino es del 74,4% (61/82). Mientras que la resistencia a ciprofloxacino, norfloxacino, ofloxacino, levofloxacino, lomefloxacino, fleroxacino y gemifloxacino es del 86,6% (71/82). Observar la gráfica N° 1.



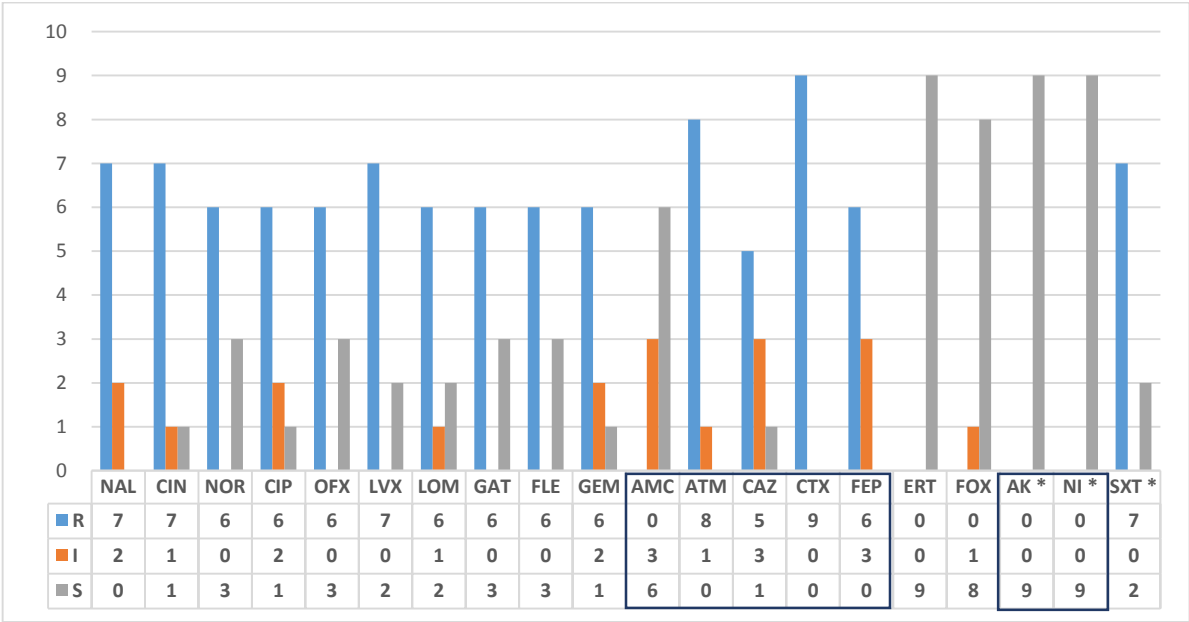
**Gráfica N° 1.** Perfil de susceptibilidad a quinolonas en *Escherichia coli* productoras de BLEE del servicio de Microbiología del HONADOMANI “San Bartolomé” (n=82).

Fuente: Elaboración propia

En los aislados que presentaron al gen *qnrB*, se observó una elevada frecuencia de resistencia a quinolonas siendo el 77,78% para ácido nalidíxico, cinoxacino y levofloxacino; y el 66,67% para norfloxacino, ciprofloxacino, ofloxacino, fleroxacino,

lomefloxacin, gatifloxacin y gemifloxacin. Mientras que en betalactámicos el 88,89% es resistente a aztreonam; el 55,56% es resistente, a ceftazidima; y el 100% resistente a cefotaxima; además, es sensible al inhibidor de betalactamasas amoxicilina/clavulánico con el 66,67%.

Sin embargo, para otros antibióticos, estas cepas presentaron resistencia a trimetoprima/sulfametoxazole en un 77,78%, sensibilidad a cefoxitina en un 88,89% y sensibilidad a aminoglucósidos y ertapenem en un 100% para ambos antibióticos, como se observa en la gráfica N° 2.



**Gráfica N° 2.** Frecuencia del perfil de susceptibilidad de los antibióticos en *Escherichia Coli* productoras de BLEE que presentan el gen *qnrB*. \*Perfil de susceptibilidad de antibióticos determinados en VITEK® 2 Compact.

Fuente: Elaboración propia



## FRECUENCIA DEL GEN *qnrB* POR GRUPOS DE ESTUDIO

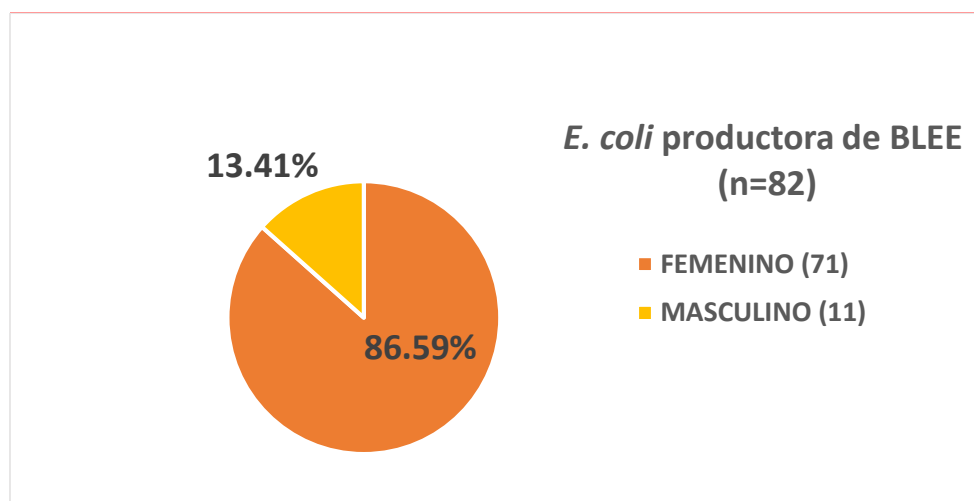
La resistencia a fluoroquinolonas es de 86,59% (71/82) del total de aislados. El gen *qnrB* estuvo presente en 3 aislados sensibles y en 6 aislados resistentes a fluoroquinolonas. El 27,27% (3/11) del total de aislados sensibles a fluoroquinolonas presentó el gen *qnrB* y el 8,45% (6/71) del total de *E. coli* resistentes a fluoroquinolonas presentaron el gen en estudio. Observar en la tabla N° 8.

**Tabla N° 8.** Frecuencia del gen *qnrB* de acuerdo al perfil de susceptibilidad a fluoroquinolonas

Perfil de susceptibilidad a fluoroquinolonas	<i>E. coli</i> BLEE positivo		<i>qnrB</i> positivo	
	(n)	(%)	(n)	(%)
Resistente	71	86,59	6	8,45
Sensible	11	13,41	3	27,27%
Total (n)	82	100,00	9	--

Fuente: Elaboración propia

De los 82 aislados de *E. coli* productoras de BLEE, se encontró que el 13,41% (11/82) fueron de sexo masculino; y que el 86,59% (71/82) fue de sexo femenino, como se muestra en la Gráfica N° 3.



**Gráfica N° 3.** *E.coli* productora de BLEE de acuerdo al género.

Fuente: Elaboración propia

Del total de las muestras que presentan el gen *qnrB*; 8,54% son del género femenino y 2,44% del género masculino. Además, la frecuencia del gen *qnrB* en el total de pacientes femeninos fue de 9,86% (7/71), mientras que del total de los pacientes masculinos fue de 18,18% (2/11), tal como se muestra en la Tabla N° 9.

**Tabla N° 9.** Frecuencia del gen *qnrB* de acuerdo al género

<b>Género</b>	<b><i>E. coli</i> BLEE positivo</b>		<b><i>qnrB</i> positivo</b>	
	<b>(n)</b>	<b>(%)</b>	<b>(n)</b>	<b>(%)</b>
<b>Femenino</b>	71	86,59	7	9,86
<b>Masculino</b>	11	13,41	2	18,18
<b>Total (n)</b>	82	100,00	9	--

Fuente: Elaboración propia

Los pacientes menores de 5 años fueron el 28,05% (23/82) del total, de 36 a 46 años fue 19,51% (16/82), de 47 a 60 años fue 13,41% (11/82), mientras que de 21 a 27 años y de 28 a 35 años fue el 9,76% (8/82). En pacientes de 47 a 60 años, el gen *qnrB* estuvo presente en el 27,27%; seguido de pacientes mayores a 60 años y menores de 5 años con el 14,29% y 13,05%, respectivamente, como se muestra en la tabla N° 10.

**Tabla N° 10.** Frecuencia del gen *qnrB* de acuerdo al grupo etario

<b>Edad (años)</b>	<b><i>E. coli</i> BLEE positivo</b>		<b><i>qnrB</i> positivo</b>	
	<b>(n)</b>	<b>(%)</b>	<b>(n)</b>	<b>(%)</b>
<b>0-5</b>	23	28,05	3	13,04
<b>6-13</b>	7	8,54	0	0
<b>14-20</b>	2	2,44	0	0
<b>21-27</b>	8	9,76	1	12,5
<b>28-35</b>	8	9,76	1	12,5
<b>36-46</b>	16	19,51	0	0
<b>47-60</b>	11	13,41	3	27,27
<b>&gt;60</b>	7	8,54	1	14,29
<b>Total (n)</b>	82	100,00	9	--

Fuente: Elaboración propia

Los pacientes ambulatorios fueron el 87,8% (72/82) del cual el 9,72% (7/72) presentó el gen *qnrB*; mientras que los pacientes hospitalizados fueron el 12,2% (10/82) de los cuales, el 20% (2/10) presentan el gen *qnrB*. Observar la tabla N° 11.

**Tabla N° 11.** Frecuencia del gen *qnrB* de acuerdo a la procedencia del paciente.

Procedencia	<i>E. coli</i> BLEE positivo		<i>qnrB</i> positivo	
	(n)	(%)	(n)	(%)
Hospitalización	10	12,20	2	20
Ambulatorio	72	87,80	7	9,72
<b>Total (n)</b>	82	100,00	9	--

Fuente: Elaboración propia

#### ASOCIACIÓN ENTRE ANTIBIÓTICOS DE QUNOLONAS Y EL GEN *qnrB*

Los resultados de la asociación del perfil de susceptibilidad a quinolonas, la presencia del gen *qnrB* y su frecuencia se observan en la tabla N° 12.

La frecuencia del gen *qnrB* en *E. coli* productoras de BLEE resistentes a ácido nalidíxico fue de 8,54% e intermedio con 2,44%; además, existe asociación entre la presencia del gen *qnrB* y la resistencia al ácido nalidíxico (0,001;  $p < 0,05$ ). En los aislados de *E. coli* productoras de BLEE, la frecuencia del gen *qnrB* resistentes a cinoxacino fue de 8,54%. No existe diferencia significativa entre estas dos variables, (0,085;  $p > 0,05$ ).

En los resultados de las quinolonas de segunda generación, se observa que existe *diferencia significativa* entre el gen *qnrB* y la resistencia a ciprofloxacino (0,007;  $p < 0,05$ ); sin embargo, entre el gen *qnrB* y la resistencia a norfloxacino no existe diferencia significativa (0,117;  $p > 0,05$ ), al igual que entre la resistencia a ofloxacino y el gen *qnrB* (0,063;  $p > 0,05$ ). La frecuencia del gen *qnrB* y la resistencia a ciprofloxacino, norfloxacino y ofloxacino del total de aislados fue de 7,32% para los tres antibióticos.

La frecuencia de gen *qnrB* y resistencia a lomefloxacino y fleroxacino, del total de aislados de *E. coli* productoras de BLEE, también fue de 7,32%; no existe diferencia significativa entre el gen *qnrB* y la resistencia a lomefloxacino (0,165;  $p > 0,05$ ) y, de igual manera, entre el gen *qnrB* y fleroxacino (0,070;  $p > 0,05$ ).

En quinolonas de tercera generación, el levofloxacino y la presencia del gen *qnrB*, no tienen diferenciación significativa, (0,592;  $p > 0,05$ ) y la frecuencia del gen *qnrB* en aislados de *E. coli* productoras de BLEE y resistente a Levofloxacino es de 77,78%.

Entre las quinolonas de cuarta generación de nuestro estudio, se observa que no existe diferencia significativa entre el gen *qnrB* y la resistencia al gatifloxacino, (0,221;  $p > 0,05$ ). Pero, entre el antibiótico de gemifloxacino y *qnrB*, sí existe diferencia significativa (0,007;  $p < 0,05$ ). La frecuencia del gen *qnrB* del total de *E. coli* productoras de BLEE y resistentes a gatifloxacino y gemifloxacino fue 7,32% en ambos casos.

**Tabla N° 12.** Presencia del gen *qnrB* y el perfil de susceptibilidad a quinolonas

Quinolonas	Susceptibilidad	Frecuencia (n)	Frecuencia (%)	<i>qnrB</i> (n)	<i>qnrB</i> en n=82 (%)	<i>qnrB</i> por R,I,S (%)	Chi <sup>2</sup>
<b>Ácido Nalidíxico</b>	Resistente	78	95,12	7	8,54	8,97	$p=0,001^*$
	Intermedio	2	2,44	2	2,44	100,00	
	Sensible	2	2,44	0	0,00	0,00	
<b>Cinoxacino</b>	Resistente	77	93,90	7	8,54	9,09	$p=0,085$
	Intermedio	2	2,44	1	1,22	50,00	
	Sensible	3	3,66	1	1,22	33,33	
<b>Norfloxacino</b>	Resistente	71	86,59	6	7,32	8,45	$p=0,117$
	Intermedio	1	1,22	0	0,00	0,00	
	Sensible	10	12,20	3	3,66	30,00	
<b>Ciprofloxacino</b>	Resistente	71	86,59	6	7,32	8,45	$p=0,007^*$
	Intermedio	3	3,66	2	2,44	66,67	
	Sensible	8	9,76	1	1,22	12,50	
<b>Ofloxacino</b>	Resistente	71	86,59	6	7,32	8,45	$p=0,063$
	Intermedio	0	0,00	0	0,00	0,00	
	Sensible	11	13,41	3	3,66	27,27	
<b>Lomefloxacino</b>	Resistente	71	86,59	6	7,32	8,45	$p=0,165$
	Intermedio	3	3,66	1	1,22	33,33	
	Sensible	8	9,76	2	2,44	25,00	
<b>Fleroxacino</b>	Resistente	71	86,59	6	7,32	8,45	$p=0,070$
	Intermedio	2	2,44	0	0,00	0,00	
	Sensible	9	10,98	3	3,66	33,33	
<b>Levofloxacino</b>	Resistente	71	86,59	7	8,54	9,86	$p=0,592$
	Intermedio	1	1,22	0	0,00	0,00	
	Sensible	10	12,20	2	2,44	20,00	
<b>Gatifloxacino</b>	Resistente	61	74,39	6	7,32	9,84	$p=0,221$
	Intermedio	8	9,76	0	0,00	0,00	
	Sensible	13	15,85	3	3,66	23,08	
<b>Gemifloxacino</b>	Resistente	71	86,59	6	7,32	8,45	$p=0,007^*$
	Intermedio	3	3,66	2	2,44	66,67	
	Sensible	8	9,76	1	1,22	12,50	

\*Si  $p < 0,05$ ; existe diferencia significativa

Fuente: Elaboración propia

## **CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN**

#### 4. DISCUSIÓN

La resistencia bacteriana a quinolonas ha sido documentada durante los últimos años, debido a su incremento en diferentes países del mundo <sup>(79)</sup>. Los mecanismos de resistencia a quinolonas se pueden dar cromosómicamente (Alto nivel de resistencia) o por plásmido (bajo nivel de resistencia) <sup>(64)</sup>.

La resistencia a quinolonas cromosómicas o de alto nivel se da por la mutación en los genes la *gyrA*, *gyrB*, *parC* o *parE*, en consecuencia, se genera la resistencia bacteriana ante quinolonas <sup>(65)</sup>. Por otro lado, los mecanismos de resistencia plasmídica a quinolonas son también denominados como bajo nivel de resistencia a quinolonas, y uno de los genes que forma parte de este grupo son los *qnr*, quienes se encargan de proteger a las topoisomerasas evitando la acción de las quinolonas y permitiendo el desarrollo de los mecanismos de alto nivel de resistencia <sup>(64) (70)</sup>.

Si bien los mecanismos cromosómicos determinan la resistencia a quinolonas, los mecanismos plasmídicos también son de importancia, debido a que estos se diseminan con mayor rapidez. Los genes de resistencia plasmídica pueden localizarse en un mismo *cassete* junto a otros genes de resistencia que se transmiten por este medio como las betalactamasas de espectro extendido (*bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>CAZ</sub>, *bla*<sub>CRO</sub> y otros) <sup>(65)</sup>.

En nuestro estudio, se encontró que el 74,39% de los aislados fue resistente a todos los antibióticos de quinolonas, demostrando una elevada frecuencia de resistencia a estos antibióticos. En el estudio realizado por Blanco et al. (2016), obtuvieron como resultado que de las *E. coli* productoras de BLEE, el 88,8% (48/54) fue resistente a ciprofloxacino; y de los antibióticos betalactámicos, el 25% fue resistente a ceftazidima y el 42% a ceftriaxona y cefotaxima <sup>(94)</sup>. En el presente estudio, el resultado fue muy similar con los antibióticos de quinolona, porque se obtuvo que la resistencia a ácido nalidíxico fue de 95,1% y a ciprofloxacino de 86,6%. Sin embargo, para los antibióticos betalactámicos se obtuvo que el 100% de los aislados fueron resistentes a cefotaxima y el 70,7% fue resistente a ceftazidima; mientras que, para otros antibióticos, el 82,93% fue resistente a

trimetropin sulfametoxazole y sensibles a amikacina y nitrofurantoína con el 95,12% y 92,68%, respectivamente.

Los genes plasmídicos *qnr* también contribuyen al incremento de resistencia bacteriana a quinolonas porque pueden transferirse en un mismo plásmido junto a otros genes de resistencia. El gen *qnrB* ha sido la variable de estudio en nuestra investigación por ser identificada como el más frecuente de los tipos de *qnr* en diferentes estudios.

Pallecchi et al. (2009), en su estudio realizado en Bolivia y Perú encontraron una prevalencia de 54% (167/310) de gen *qnrB* en el total de enterobacterias comensales <sup>(18)</sup>. Asimismo en el 2010, en otro estudio realizado también en ambos países, la investigadora reportó que el 6% (6/107) del total de aislados de *E. coli* resistentes a ciprofloxacina, presentó el gen *qnrB* <sup>(95)</sup>. En nuestro estudio, se encontró que de los 82 aislados de *E. coli* productoras de BLEE, se obtuvo que la frecuencia del gen *qnrB* fue del 10,9%. Este resultado fue diferente al primer trabajo realizado por Pallecchi, donde utilizaron al total de enterobacterias para identificar al *qnrB*, mientras que, el estudio realizado en el 2010 fue muy cercano al nuestro, donde en ambos estudios fueron realizados en *E. coli* con elevada frecuencia de resistencia a ciprofloxacino.

En nuestro trabajo, se demostró que el 8,45% (6/71) de la *E. coli* productoras de BLEE resistentes a ciprofloxacino presentaba el gen *qnrB*. Estos datos difieren de los resultados obtenidos por Pakzad et al. (2011) en su estudio realizado en Irán, donde determinaron que el gen *qnrA* fue el más prevalente con 37,5%, seguido del gen *qnrB* con 20,8% del total e aislados de *E. coli* productoras de BLEE resistentes a ciprofloxacino <sup>(96)</sup>. Al igual que Pakazad et al., Harifi et al. (2015) en Irán, determinó que la frecuencia del gen *qnrB* es del 17%, siendo el gen *qnrA* el más frecuente con 31% en aislados de *E. coli* productores de BLEE y resistentes a ciprofloxacino <sup>(97)</sup>.

En los estudios realizados en Argentina por Andres et al. (2013), nos muestra que la frecuencia del gen *qnrB* es alta en enterobacterias de este país, encontrándose resultados de *qnrB* con 47,6% (50/105) del total de enterobacterias aisladas, además, la frecuencia de BLEE fue de 38% y no se encontró asociación de BLEE con los genes *qnrB* para



especies de *E. coli* <sup>(5)</sup>. En otro estudio realizado también en Argentina, Rincon et al. (2013) encontraron que el 66% (33/50) de los aislados de enterobacterias productoras de BLEE tenían al menos un determinante de PMQR, del cual el 57,57% (19/33) presentaban el gen *qnrB* <sup>(6)</sup>.

Pero, así como se han reportado datos elevados de *qnrB*, también se publicaron estudios donde demuestran poca frecuencia del gen en Argentina. Saba et al. (2014) publicaron los resultados de su investigación donde en solo 6 aislados de 101 enterobacterias productoras de BLEE estuvo presente el gen *qnrB*, siendo 4 de ellas *E. coli* <sup>(98)</sup>. Por otro lado, Quiroga et al. (2007), también en el mismo país, encontraron que de las enterobacterias resistentes a ciprofloxacino, 8 de 18 aislados presentaban el gen *qnrB* y ninguno de *qnrA* ni *qnrS* <sup>(99)</sup>.

En México, Silva et al. (2013), mostraron que la presencia de BLEE y PMQR es del 32,1% en enterobacterias de pacientes pediátricos y que el gen *qnr* estuvo presente en el 13,6% de las *E. coli*, de los cuales el 94,1% (16/17) fue *qnrB* <sup>(4)</sup>. Nuestro resultado fue muy cercano a lo obtenido por Silva et al., a pesar que su estudio se realizó en 112 enterobacterias, mientras que en nuestro trabajo fue en 82 *E. coli* productoras de BLEE.

En nuestro estudio, se obtuvo que la población más afectada por enfermedades infecciosas urinarias es femenina, con un 86,59% (71/82); sin embargo, la presencia del gen *qnrB* fue más frecuente en pacientes masculinos con el 18,18% (2/11); mientras que del total de pacientes femeninos solo 9,86% (7/71) portaba el gen en estudio. Ramírez et al. (2018), en México, obtuvieron que, de los pacientes femenino y masculino, el 19,8% (17/86) y 25% (6/24) presentaban el gen *qnrB*, respectivamente <sup>(100)</sup>.

Según grupo etario, los pacientes de 0 a 5 años de edad fueron los más frecuentes en nuestra investigación con el 28,05% (23/82). La presencia del *qnrB* fue el 27,27% (3/11) de pacientes de 47 a 60 años. En el estudio de Ramírez et al. (2018), la población más frecuente fue de 2 a 10 años de edad con el 34,5% (38/110), muy parecida al de nuestro trabajo <sup>(100)</sup>.

Además, Ramírez et al. (2018) encontraron que la resistencia a ciprofloxacino y levofloxacino fue de 47,3% (52/110) y 43,6% (48/110), respectivamente, y la presencia del gen *qnrB* fue del 20,9% (23/110); siendo el *qnrA* más frecuente con el 22,7% (25/110). En nuestro estudio obtuvimos menor frecuencia de *qnrB*; sin embargo, la frecuencia de resistencia a ciprofloxacino y levofloxacino del total de aislados fue del 86,6% (71/82) en ambos antibióticos <sup>(100)</sup>.

Asimismo, García et al. (2018), en su estudio realizado en Venezuela, demostraron que el 33,6% del total de enterobacterias aisladas presentaron el gen *qnrB* y de estos el 45,7% fueron *E. coli*, de los cuales el 72,4% y 67,2% fue resistente a ácido nalidíxico y ciprofloxacino, respectivamente <sup>(8)</sup>. En nuestro trabajo la frecuencia de *qnrB* fue menor a lo publicado en Venezuela y de los aislados resistentes a ácido nalidíxico y ciprofloxacino, el gen *qnrB* estuvo presente en el 77,78% y 66,67%, respectivamente.

En otro trabajo realizado en Lima (Perú) por Toribio et al. (2019), de las cepas de estudio que fueron recolectadas entre agosto del 2012 y enero del 2013, se obtuvo que el 27,5% del total de enterobacterias presentó el gen *qnrB*, y el 34,2% de este grupo fueron *E. coli* portadoras de betalactamasas tipo CTX-M <sup>(11)</sup>. En nuestro estudio, la frecuencia del gen *qnrB* es menor que el estudio mencionado, que también presentó resistencia a CTX-M en el 100% de los aislados. Sin embargo, nuestros resultados son semejantes al estudio realizado por Pons et al. (2013) en Lima (Perú), donde obtuvieron que de las *E. coli* diarrogénicos y no diarrogénicos; el 8,3% presentó el gen *qnrB*, mientras que para el gen plasmídico *aac(6')-Ib-cr* se obtuvo el 27% <sup>(101)</sup>.

En los estudios realizados en otros continentes en identificación de genes plasmídicos, también nos muestran la frecuencia del gen *qnrB*, como lo es en Lóme, (Togo, África), donde Djimabi et al. (2019) encontraron que, del total de enterobacterias, el 47,74% presentaba el gen *qnrB*, siendo *E. coli* el 55,4%. Además, indican que del total de aislados que codifican *qnr*, el 90,48% fue resistente a ácido nalidíxico y el 93,46% fue resistente a ciprofloxacino <sup>(102)</sup>. Mientras que, en Japón, solo el 12,8% era resistente a ciprofloxacino y productoras de BLEE de aislados de *E. coli*; y no se encontró la presencia de ningún

subtipo de gen *qnr*<sup>(103)</sup>. En Indonesia, Septa et al. (2018) encontraron que el 52% del total de aislados de *E. coli* son resistentes a ciprofloxacina. El gen *qnr* más frecuente fue *qnrA* con 61,6% (8/13) seguido del *qnrB* con 7,7%(1/13) y *qnrS* 23% (3/13)<sup>(104)</sup>.

Irán es uno de los países donde se ha realizado numerosas publicaciones en resistencia mediada por mecanismos plasmídicos (PMQR). Rezazadeh et al. (2016), en hospitales de Qazvin y Zanjan, encontraron que el 67,5% presenta resistencia a ácido nalidíxico y el 58% a gatifloxacino; mientras que la resistencia a norfloxacino y ciprofloxacino fue de 44,5% y 44%<sup>(7)</sup>. A diferencia del estudio realizado por Pakzad et al., en el 2011<sup>(96)</sup>, Rezazadeh et al. encontraron solo 2,5% de gen *qnrS* y ninguno de *qnrA* ni *qnrB*. Del mismo modo, Ranjbar et al. 2018, en su investigación también realizada en Teherán (Irán), determinaron que el 96,8% presentó el gen *qnrS* y ninguno de *qnrA* ni *qnrB*<sup>(105)</sup>.

Nuestro trabajo brinda resultados diferentes a los últimos estudios reportados en Irán, debido a que la presencia del gen *qnrB* en nuestro país es más alta. Además, del total de aislados, la frecuencia de resistencia a ácido nalidíxico y fluoroquinolonas es de 95,1% y 86,6%, respectivamente, mayor a lo reportado por los investigadores<sup>(7)(105)</sup>.

Los genes plasmídicos también pueden encontrarse en bacterias del medio ambiente; es por ello que, además de realizarse estudios de pacientes atendidos en los diferentes hospitales, investigadores como Ranjbar et al. (2017) también realizaron estudios de las fuentes de aguas residuales de los hospitales de Irán, encontrando resistencia a ácido nalidíxico, norfloxacino y ciprofloxacino con el 60%, 30% y 25%, respectivamente. La frecuencia de gen *qnr* es de 47,1%, del cual un 45,8% fue para *qnrB* y un 29,2% para *qnrS*<sup>(106)</sup>. En la India, Chandran et al. (2014) realizaron un estudio de fuentes de agua residuales en el que se encontró, que el 51% de los aislados de *E. coli* fue resistente a quinolonas, del cual el 16% presentó el gen *qnr*. Sin embargo, en este último estudio determinaron que la presencia de genes plasmídicos como *aac-(6)-Ib-cr* fueron los más frecuentes con un 89%, de igual manera los genes cromosómicos con un 97% (*gyrA* y *parC*)<sup>(107)</sup>.

Otro estudio realizado por Zurfluh et al. (2014), en los lagos y ríos de Suiza, encontraron que la presencia de mutaciones en *gyrA*, *parC* y *parE* fueron en 40 de los 42 aislados resistentes a fluoroquinolonas, sin embargo, a pesar de no haber presentado genes de *qnrB*, se encontraron otros genes plasmídicos como el *aac(6')-Ib-cr* y *qnrS1* en el 36% y 10%, respectivamente <sup>(108)</sup>. Esto demuestra la importancia de los estudios en la identificación de genes plasmídicos, porque al estar presente en el ambiente representan peligro para las personas, por la facilidad de su diseminación, propagando la resistencia bacteriana a quinolonas y a otros antibióticos en enterobacterias que se encuentran en estado salvaje.

La frecuencia de los genes PMQR en los países de Sudamérica y de otros continentes en el mundo es alarmante por los elevados porcentajes que se muestran en los estudios ya mencionados. El gen *qnrB*, uno de los genes que se transmiten por este mecanismo, pueden ser transportadas junto a genes como *qnrA*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr*, *bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, etc. causando multirresistencia bacteriana, lo cual conllevaría a usar antibióticos con mayor potencia y espectro de acción, generando nuevos mecanismos de resistencia bacteriana.

En el presente estudio, la frecuencia del gen *qnrB* fue menor a otros estudios, encontrándose en el 10,9% del total de aislados; el cual se esperaba obtener un porcentaje mayor al 30%, tal como se mencionaba en estudios similares, por lo que, la hipótesis planteada ha sido rechazada <sup>(8)(11)</sup>. Sin embargo, no se buscó la presencia de otros genes plasmídicos (PMQR), por lo que no se descartaría que estos estén presentes. Además, la frecuencia de resistencia a quinolonas de primera, segunda, tercera y cuarta generación de nuestra investigación es muy elevada, lo que indicaría que estarían presentes genes de alto nivel de resistencia a quinolonas.

## **CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

## 5.1.CONCLUSIONES

- ❖ En el presente estudio se encontró que el 10,9% de *Escherichia coli* productoras de BLEE presentan el gen *qnrB*.
- ❖ En los aislados que presentaron el gen *qnrB*; la resistencia a quinolonas de primera generación y tercera generación fueron del 77,78%; mientras que la resistencia a quinolonas de segunda y cuarta generación fueron del 66,67%.
- ❖ El gen *qnrB* está presente en menos en 9,09% de aislados resistentes a quinolonas de primera generación; mientras que en quinolonas de segunda, tercera y cuarta generación fue de 8,45%; 9,86% y 9,84% respectivamente. No se encontró presencia del gen *qnrB* en aislados sensible a ácido nalidíxico, sin embargo, este gen estuvo presente en más del 12,5% (CIP y GEM), mientras que las demás fueron superior al 25%, pero inferior al 33,33% (CIN y FLE).
- ❖ El gen *qnrB* estuvo más frecuente en el género masculino con el 18,18%; según el grupo etáreo, está presente con más frecuencia en pacientes de 47 a 60 años con el 27,27%. Además, la presencia del gen *qnrB* estuvo más frecuente en pacientes hospitalizados con el 20%.
- ❖ Se encontró que el 86,6% de los aislados fueron resistente a quinolonas de segunda, tercera y cuarta generación; mientras que la resistencia a quinolonas de primera generación como el ácido nalidíxico, cinoxacino y gatifloxacino fue de 95,1%; 93,9% y 74,4% respectivamente. Estos resultados revelaron elevada relación entre la producción de enzimas de betalactamasas de espectro extendido y la resistencia a quinolona.
- ❖ La hipótesis planteada ha sido rechazada, debido a que en nuestro estudio se determinó el 10,9% de *qnrB*, menor al porcentaje esperado de 30%.

## 5.2. RECOMENDACIONES

- ❖ Las autoridades dedicadas al bienestar de la salud deberían establecer más vigilancia epidemiológica y promover medidas de prevención para evitar la diseminación de la resistencia bacteriana.
- ❖ Actualización de la guía terapéutica en nuestro país e involucrar al personal de salud para la reducción de las IAAS (Infecciones Asociadas a la Atención en Salud).
- ❖ Evitar el uso indiscriminado de las quinolonas, debido a la elevada relación entre la resistencia a quinolonas y BLEE, para disminuir la multirresistencia bacteriana.
- ❖ Realizar más estudios de la presencia de genes plasmídicos de resistencia a quinolonas en centros hospitalarios para evitar su diseminación.
- ❖ Controlar el uso indiscriminado de los antimicrobianos, en la dosis de antibióticos en productos industriales y animales, para no generar resistencia bacteriana.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sarmiento AF, Mejia MN, Rozas AB, Giraldo CA, Málaga G. Frecuencia y factores de riesgo para bacteriemia por enterobacterias productoras de betalactamasa de espectro extendido en pacientes de un hospital público de Lima, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 5 de abril de 2018;35(1):62-7.
2. Colquechagua Aliaga F, Sevilla Andrade C, Gonzales Escalante E. Enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido en muestras fecales en el Instituto Nacional de Salud del Niño, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*. enero de 2015;32(1):26-32.
3. Pallecchi L, Riccobono E, Mantella A, Fernandez C, Bartalesi F, Rodriguez H, et al. Small qnrB-harboursing ColE-like plasmids widespread in commensal enterobacteria from a remote Amazonas population not exposed to antibiotics. *J Antimicrob Chemother*. 1 de mayo de 2011;66(5):1176-8.
4. Silva-Sánchez J, Cruz-Trujillo E, Barrios H, Reyna-Flores F, Sánchez-Pérez A, Garza-Ramos U. Characterization of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance (PMQR) Genes in Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae Pediatric Clinical Isolates in Mexico. *PLoS One* [Internet]. 17 de octubre de 2013 [citado 26 de abril de 2018];8(10). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3798427/>
5. Andres P, Lucero C, Soler-Bistué A, Guerriero L, Albornoz E, Tran T, et al. Differential Distribution of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in Clinical Enterobacteria with Unusual Phenotypes of Quinolone Susceptibility from Argentina. *Antimicrob Agents Chemother*. junio de 2013;57(6):2467-75.
6. Cruz GR, Radice M, Sennati S, Pallecchi L, Rossolini GM, Gutkind G, et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants among oxyiminocephalosporin-resistant Enterobacteriaceae in Argentina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. noviembre de 2013;108(7):924-7.
7. Rezazadeh M, Baghchesaraei H, Peymani A. Plasmid-Mediated Quinolone-Resistance (qnr) Genes in Clinical Isolates of *Escherichia coli* Collected from Several Hospitals of Qazvin and Zanjan Provinces, Iran. *Osong Public Health and Research Perspectives*. 1 de octubre de 2016;7(5):307-12.



8. García J, Martínez D, Caña L, González D, Rodríguez L, Rodolfo H, et al. Genes qnr en Enterobacteriaceae aisladas en un hospital de Venezuela. *Revista chilena de infectología*. abril de 2018;35(2):147-54.
9. FarajzadehSheikh A, Veisi H, Shahin M, Getso M, Farahani A. Frequency of quinolone resistance genes among extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections. *Trop Med Health* [Internet]. 4 de marzo de 2019 [citado 21 de octubre de 2019];47. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6399935/>
10. Malekzadegan Y, Rastegar E, Moradi M, Heidari H, Sedigh Ebrahim-Saraie H. Prevalence of quinolone-resistant uropathogenic *Escherichia coli* in a tertiary care hospital in south Iran. *Infect Drug Resist*. 19 de junio de 2019;12:1683-9.
11. Toribio Arias LJ, Sevilla Andrade CR, Gonzales-Escalante E. Marcadores de resistencia plasmídica a quinolonas qnr en aislamientos clínicos de enterobacterias productoras de betalactamasas CTX-M en Lima, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*. junio de 2019;36(2):265-9.
12. Suárez V. Vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos en bacterias de origen hospitalario. *Surveillance of antimicrobial resistance in bacteria from a hospital* [Internet]. noviembre de 2007 [citado 12 de julio de 2020]; Disponible en: <https://repositorio.ins.gob.pe/handle/INS/610>
13. World Health Organization, editor. *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2014. 232 p.
14. OMS | Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos [Internet]. WHO. [citado 18 de mayo de 2020]. Disponible en: <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/global-action-plan/es/>
15. Vizcarra Cornejo MA, Del Solar Labarthe S, Tomás Gonzáles E. Decreto Supremo N° 010-2019-SA, Diario Oficial El Peruano. 16 de Mayo 2019. 2019;3.
16. Resolución Ministerial N° 1361-2018-MINSA [Internet]. [citado 18 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.gob.pe/institucion/minsa/normas-legales/235768-1361-2018->
17. Lee C-H, Liu J-W, Li C-C, Chien chun chih, Tang Y-F, Su L-H. Spread of ISCR1 Elements Containing blaDHA-1 and Multiple Antimicrobial Resistance Genes Leading to Increase of Flomoxef Resistance in Extended-Spectrum-  $\beta$ -Lactamase-

Producing *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1 de septiembre de 2011;55:4058-63.

18. Pallecchi L, Riccobono E, Mantella A, Bartalesi F, Sennati S, Gamboa H, et al. High Prevalence of qnr Genes in Commensal Enterobacteria from Healthy Children in Peru and Bolivia. Antimicrob Agents Chemother. junio de 2009;53(6):2632-5.
19. Rodríguez-Angeles G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud pública Méx, Salud pública Méx. septiembre de 2002;44:464-75.
20. *E. coli* [Internet]. World Health Organization. [citado 27 de abril de 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>
21. Bien J, Sokolova O, Bozko P. Role of Uropathogenic *Escherichia coli* Virulence Factors in Development of Urinary Tract Infection and Kidney Damage. Int J Nephrol [Internet]. 2012 [citado 27 de abril de 2018];2012. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3312279/>
22. Poolman JT, Wacker M. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*, a Common Human Pathogen: Challenges for Vaccine Development and Progress in the Field. J Infect Dis. 1 de enero de 2016;213(1):6-13.
23. Terlizzi ME, Gribaudo G, Maffei ME. UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Infections: Virulence Factors, Bladder Responses, Antibiotic, and Non-antibiotic Antimicrobial Strategies. Front Microbiol [Internet]. 15 de agosto de 2017 [citado 27 de abril de 2018];8. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5559502/>
24. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. Nat Rev Microbiol. mayo de 2015;13(5):269-84.
25. Foxman B. Urinary tract infection syndromes: occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. Infect Dis Clin North Am. marzo de 2014;28(1):1-13.
26. Alanazi MQ, Alqahtani FY, Aleanizy FS. An evaluation of *E. coli* in urinary tract infection in emergency department at KAMC in Riyadh, Saudi Arabia: retrospective study. Ann Clin Microbiol Antimicrob [Internet]. 9 de febrero de 2018 [citado 27 de

- abril de 2018];17. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5806437/>
27. Morejón García M. Betalactamasas de espectro extendido. *Revista Cubana de Medicina*. diciembre de 2013;52(4):272-80.
  28. García-Hernández AM, García-Vázquez E, Hernández-Torres A, Ruiz J, Yagüe G, Herrero JA, et al. Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales. *Revista española de quimioterapia*. 2011;24(2).
  29. Miranda García M. *Escherichia coli* portador de betalactamasas de espectro extendido: resistencia [Internet]. [citado 15 de diciembre de 2019]. Disponible en: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1887-85712013000400003](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1887-85712013000400003)
  30. José Antonio VS. Descubrimiento de la penicilina. *Revista SCientífica*. /;78.
  31. Tan SY, Tatsumura Y. Alexander Fleming (1881–1955): Discoverer of penicillin. *Singapore Med J*. julio de 2015;56(7):366-7.
  32. Belloso WH. Historia de los antibióticos. *Rev Hosp Ital B Aires*. 2009;29:102–11.
  33. Abarca G, Herrera ML. Betalactamasas: su importancia en la clínica y su detección en el laboratorio. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr Carlos Sáenz Herrera*. enero de 2001;36(1-2):77-104.
  34. Vignoli R, Seija V. Temas de Bacteriología y Virología Médica [Internet]. 2007 [citado 15 de diciembre de 2019]. Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/cefaed2006.htm>
  35. Cantón R, Valverde A, Novais A, Baquero F, Coque T. Evolución y panorama actual de las BLEE. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2007;25(Supl 2):2–10.
  36. Rivera-Jacinto M, Rodríguez-Ulloa C, Flores Clavo R, Serquén López L, Arce Gil Z. Betalactamasas de espectro extendido tipo TEM y CTX-M en *Klebsiella* spp y *Escherichia coli* aisladas de superficies de ambientes hospitalarios. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*. octubre de 2015;32(4):752-5.
  37. Clavo SM, Cillero MTM, Rubio FJL, de Servicio J. Tratamiento de las infecciones producidas por beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE). Formación continuada para farmacéuticos de Hospital V. 2012;97–127.

38. Huletsky A, Knox JR, Levesque RC. Role of Ser-238 and Lys-240 in the hydrolysis of third-generation cephalosporins by SHV-type beta-lactamases probed by site-directed mutagenesis and three-dimensional modeling. *J Biol Chem*. 15 de febrero de 1993;268(5):3690-7.
39. Ruiz M, Alexandra E. Determinación de la frecuencia del gen CTX-M que codifica  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido (BLEE) EN *Escherichia coli* uropatógenas aisladas en el Hospital Guillermo Almenara de marzo a mayo del año 2012. Repositorio de Tesis - UNMSM [Internet]. 2015 [citado 24 de agosto de 2018]; Disponible en: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/4589>
40. Bradford PA. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clin Microbiol Rev*. octubre de 2001;14(4):933-51.
41. Suárez C, Gudiol F. Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009;27:116-29.
42. Stanier RY. Microbiología. Reverte; 1996. 776 p.
43. Marín M, Gudiol F. Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 1 de enero de 2003;21(1):42-55.
44. Secretaria Distrital de Salud de Bogotá. Manual de actualización en resistencia bacteriana y normas CLSI M100–S20. 2010;49-51.
45. M100Ed28 | Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 28th Edition [Internet]. [citado 5 de mayo de 2018]. Disponible en: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>
46. Castellanos DTG. Impacto de la automatización en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas. 2012;9.
47. Maguiña Vargas C, Solari Zerpa L. Nuevas y viejas quinolonas. *Revista Medica Herediana*. octubre de 2002;13(4):153-60.
48. Arés Álvarez F, Martínez de la Ossa Sáenz-López R, Alfayate Miguélez S, Arés Álvarez F, Martínez de la Ossa Sáenz-López R, Alfayate Miguélez S. Quinolonas en Pediatría. *Pediatría Atención Primaria*. junio de 2017;19(74):e83-92.

49. Mella S, Acuña G, Muñoz M, Perez C, Labarca J, Gonzales G, et al. Quinolonas: Aspectos generales sobre su estructura y clasificación. *Revista chilena de infectología*. 2000;17(1):53–66.
50. Gutiérrez-Zufiaurre N. Relación entre estructura, actividad y efectos adversos de las quinolonas. *Revista Española de Quimioterapia*, ISSN 0214-3429, Vol 17, N° 3, 2004, pags 232-243. 1 de enero de 2004;
51. Alós J-I. Quinolonas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 1 de mayo de 2009;27(5):290-7.
52. Rothlin RP. Revisión histórica. *Medicina-Buenos Aires*. 1999;59:3–6.
53. Leyva S, Leyva E. Fluoroquinolonas. Mecanismos de acción y resistencia, estructura, síntesis y reacciones fisicoquímicas importantes para propiedades medicinales. *Soc Quím Méx*. 2008;2(1):1–13.
54. Chávez-Jacobo VM, Ramírez-Díaz MI, Silva-Sánchez J, Cervantes C, Chávez-Jacobo VM, Ramírez-Díaz MI, et al. Resistencia Bacteriana a Quinolonas: Determinantes Codificados en Plásmidos. *Revista de educación bioquímica*. 2015;34(1):4-9.
55. Pinos JD de, L J, Adrover Rigó M, Ribas Sala J. Levofloxacin, fluorquinolona de tercera generación. *Farm Hosp*. 1 de septiembre de 2000;24(5):288-95.
56. King DE, Malone R, Lilley SH. New Classification and Update on the Quinolone Antibiotics. *AFP*. 1 de mayo de 2000;61(9):2741-8.
57. Álvarez-Hernández DA, Garza-Mayén GS, Vázquez-López R. Quinolonas: Perspectivas actuales y mecanismos de resistencia. *Revista chilena de infectología*. octubre de 2015;32(5):499-504.
58. Bassetti M, Pecori D, Cojutti P, Righi E, Pea F. Clinical and pharmacokinetic drug evaluation of delafloxacin for the treatment of acute bacterial skin and skin structure infections. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 2 de noviembre de 2017;13(11):1193-200.
59. Bassetti M, Della Siega P, Pecori D, Scarparo C, Righi E. Delafloxacin for the treatment of respiratory and skin infections. *Expert Opin Investig Drugs*. marzo de 2015;24(3):433-42.

60. Cué Brugueras M, Morejón García M, Salup Díaz R. Actualidad de las quinolonas. *Revista Cubana de Farmacia*. abril de 2005;39(1):1-1.
61. Dr. Héctor Alejandro Serra. Quinolonas [Internet]. Scribd. 2008 [citado 3 de octubre de 2018]. Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/220918544/Sep-Quino-Lonas-Far-Maco-Log-i-Am>
62. Alós J-I. Quinolonas. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2003;21(5):261–268.
63. Saldaña G, Toscano G. Uso de fluoroquinolonas en niños. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría*. 2013;27(106).
64. Rodríguez-Martínez JM. Mecanismos de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2005;23(1):25-31.
65. Navarro F, Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(7):524-34.
66. Navarro F, Miró E, Mirelis B. Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 1 de noviembre de 2010;28(9):638-45.
67. Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance: a Multifaceted Threat. *Clin Microbiol Rev*. octubre de 2009;22(4):664-89.
68. Hooper DC, Jacoby GA. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Ann N Y Acad Sci*. septiembre de 2015;1354(1):12-31.
69. Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N. Mechanism of Quinolone Action and Resistance. *Biochemistry*. 18 de marzo de 2014;53(10):1565.
70. Jacoby GA, Walsh KE, Mills DM, Walker VJ, Oh H, Robicsek A, et al. qnrB, Another Plasmid-Mediated Gene for Quinolone Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. abril de 2006;50(4):1178.
71. Yan L, Liu D, Wang X-H, Wang Y, Zhang B, Wang M, et al. Bacterial plasmid-mediated quinolone resistance genes in aquatic environments in China. *Scientific Reports*. 17 de enero de 2017;7:40610.

72. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*. 2013;2(2):70–78.
73. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am*. abril de 1990;262(4):56-61, 64-5.
74. Pedrosa Amado A. Reacción en cadena de la polimerasa. *Revista Archivo Médico de Camagüey* [Internet]. abril de 1999 [citado 24 de julio de 2018];3(2). Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S1025-02551999000200011&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1025-02551999000200011&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
75. (PDF) Bromuro de etidio: ¿agente mutágeno en el laboratorio? [Internet]. [citado 8 de julio de 2020]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/338687721\\_Bromuro\\_de\\_etidio\\_agente\\_mutageno\\_en\\_el\\_laboratorio](https://www.researchgate.net/publication/338687721_Bromuro_de_etidio_agente_mutageno_en_el_laboratorio)
76. SYBR® Safe DNA Gel Stain. 19/06/2007. :6.
77. SYBR Safe DNA Gel Stain in 1X TAE from Thermo Fisher Scientific | Biocompare.com [Internet]. [citado 8 de julio de 2020]. Disponible en: <https://www.biocompare.com/23236-SYBRreg-Green-Nucleic-Acid-Stains/87260-SYBR-Safe-DNA-Gel-Stain-in-1X-TAE/>
78. Cattoir V, Poirel L, Rotimi V, Soussy C-J, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J Antimicrob Chemother*. 1 de agosto de 2007;60(2):394-7.
79. OMS | ¿Qué es la resistencia a los antimicrobianos? [Internet]. WHO. [citado 16 de diciembre de 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/features/qa/75/es/>
80. Seija V, Vignoli R. Principales grupos de antibióticos. En: *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. 2006;631:647.
81. Tafur JD, Torres JA, Villegas MV. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Infectio*. 2011;12(3):217-24.
82. Navarro F, Miró E. Entorno genético de las BLEE: implicaciones en la transmisión. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 1 de enero de 2007;25 Suppl 2:11-7.
83. Baena Y, D'León LFP. Importancia y fundamentación del sistema de clasificación biofarmacéutico, como base de la exención de estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia in vivo. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*

- [Internet]. 1 de enero de 2008 [citado 16 de diciembre de 2018];37(1). Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rccquifa/article/view/1580>
84. Palma-Aguirre JA. Medicamentos genéricos, biodisponibilidad y bioequivalencia. *Gac Med Mex*. 1998;134(4):491–494.
  85. De Guglielmo C, Zoraya M, Fernandez Da Silva R. Principales promotores utilizados en la transformación genética de plantas. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2016;18(2):119–128.
  86. Di Conza JA, Gutkind GO. Integrones: los coleccionistas de genes. *Revista argentina de microbiología*. abril de 2010;42(1):63-78.
  87. Kidwell MG. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica*. 1 de mayo de 2002;115(1):49-63.
  88. Rodriguez Martinez JM. Resistencia a quinolonas mediada por plásmido en enterobacteriaceae [Internet]. Depósito de Investigación Universidad de Sevilla. 2006 [citado 18 de diciembre de 2019]. Disponible en: <https://idus.us.es/xmlui/handle/11441/15954>
  89. Consenso latinoamericano para definir, categorizar y notificar patógenos multirresistentes, con resistencia extendida o panresistentes [Internet]. [citado 18 de diciembre de 2019]. Disponible en: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6705331/?fbclid=IwAR0VMFxW4qW88IwJG7zG-fQG\\_KkwNtfdhat4K08vmgpdj\\_Yb2ehaPfLKrrM](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6705331/?fbclid=IwAR0VMFxW4qW88IwJG7zG-fQG_KkwNtfdhat4K08vmgpdj_Yb2ehaPfLKrrM)
  90. Farmacocinética y farmacodinamia de antimicrobianos: Utilidad práctica [Internet]. [citado 18 de diciembre de 2019]. Disponible en: [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-10182004021100008](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182004021100008)
  91. OMS | Sistema mundial de vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos [Internet]. WHO. [citado 15 de enero de 2020]. Disponible en: <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/surveillance-system-manual/es/>
  92. Sanchez Robaldo CW. Identificación molecular del complejo Burkholderia cepacia, bacteria productora de antibióticos, mediante PCR en Tiempo Real [Internet]. 2017 [citado 8 de julio de 2020]. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/14669/1/UPS-QT11939.pdf>



93. Pautas éticas internacionales para la investigación relacionada con la salud con seres humanos [Internet]. Council for International Organizations of Medical Sciences. [citado 30 de agosto de 2020]. Disponible en: <https://cioms.ch/publications/product/pautas-eticas-internacionales-para-la-investigacion-relacionada-con-la-salud-con-seres-humanos/>
94. Blanco VM, Maya JJ, Correa A, Perenguez M, Muñoz JS, Mota G, et al. Prevalencia y factores de riesgo para infecciones del tracto urinario de inicio en la comunidad causadas por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido en Colombia. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. noviembre de 2016; 34(9):559-65.
95. Pallecchi L, Riccobono E, Sennati S, Mantella A, Bartalesi F, Trigos C, et al. Characterization of Small ColE-Like Plasmids Mediating Widespread Dissemination of the *qnrB19* Gene in Commensal Enterobacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. febrero de 2010;54(2):678-82.
96. Pakzad I, Ghafourian S, Taherikalani M, sadeghifard N, Abtahi H, Rahbar M, et al. *qnr* Prevalence in Extended Spectrum Beta-lactamases (ESBLs) and None-ESBLs Producing *Escherichia coli* Isolated from Urinary Tract Infections in Central of Iran. *Iran J Basic Med Sci*. 2011;14(5):458-64.
97. Harifi Mood E, Meshkat Z, Izadi N, Rezaei M, Amel Jamehdar S, Naderi Nasab M. Prevalence of Quinolone Resistance Genes Among Extended-Spectrum B-Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Mashhad, Iran. *Jundishapur J Microbiol* [Internet]. 7 de diciembre de 2015 [citado 2 de diciembre de 2019];8(12). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4746706/>
98. Villarroel PMS. Caracterización de los determinantes de resistencia a  $\beta$ -lactámicos y quinolonas de localización plasmídica en enterobacterias. 2014;11-23.
99. Quiroga MP, Andres P, Petroni A, Soler Bistué AJC, Guerriero L, Vargas LJ, et al. Complex Class 1 Integrons with Diverse Variable Regions, Including *aac(6')-Ib-cr*, and a Novel Allele, *qnrB10*, Associated with *ISCR1* in Clinical Enterobacterial Isolates from Argentina. *Antimicrob Agents Chemother*. diciembre de 2007;51(12):4466-70.
100. Ramírez-Castillo FY, Moreno-Flores AC, Avelar-González FJ, Márquez-Díaz F, Harel J, Guerrero-Barrera AL. An evaluation of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates in urinary tract infections from Aguascalientes, Mexico: cross-sectional study. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* [Internet]. 24 de julio de 2018 [citado 2 de

diciembre de 2019];17. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6057003/>

101. Pons MJ, Mosquito S, Gomes C, del Valle LJ, Ochoa TJ, Ruiz J. Analysis of quinolone-resistance in commensal and diarrheagenic *Escherichia coli* isolates from infants in Lima, Peru. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* enero de 2014;108(1):22-8.
102. Salah FD, Soubeiga ST, Ouattara AK, Sadji AY, Metuor-Dabire A, Obiri-Yeboah D, et al. Distribution of quinolone resistance gene (qnr) in ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Lomé, Togo. *Antimicrob Resist Infect Control* [Internet]. 18 de junio de 2019 [citado 2 de diciembre de 2019];8. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6582466/>
103. Aoike N, Saga T, Sakata R, Yoshizumi A, Kimura S, Iwata M, et al. Molecular Characterization of Extraintestinal *Escherichia coli* Isolates in Japan: Relationship between Sequence Types and Mutation Patterns of Quinolone Resistance-Determining Regions Analyzed by Pyrosequencing. *J Clin Microbiol.* junio de 2013;51(6):1692-8.
104. Kurnia RS, Indrawati A, Mayasari NLPI, Priadi A. Molecular detection of genes encoding resistance to tetracycline and determination of plasmid-mediated resistance to quinolones in avian pathogenic *Escherichia coli* in Sukabumi, Indonesia. *Vet World.* noviembre de 2018;11(11):1581-6.
105. Ranjbar R, Tolon SS, Sami M, Golmohammadi R. Detection of Plasmid-Mediated qnr Genes Among the Clinical Quinolone-Resistant *Escherichia coli* Strains Isolated in Tehran, Iran. *Open Microbiol J.* 31 de julio de 2018;12:248-53.
106. Ranjbar R, Farahani O. The Prevalence of Plasmid-mediated Quinolone Resistance Genes in *Escherichia coli* Isolated from Hospital Wastewater Sources in Tehran, Iran. *Iran J Public Health.* septiembre de 2017;46(9):1285-91.
107. Chandran S p., Diwan V, Tamhankar A j., Joseph B v., Rosales-Klintz S, Mundayoor S, et al. Detection of carbapenem resistance genes and cephalosporin, and quinolone resistance genes along with oqxAB gene in *Escherichia coli* in hospital wastewater: a matter of concern. *Journal of Applied Microbiology.* 1 de octubre de 2014;117(4):984-95.
108. Zurfluh K, Abgottspon H, Hächler H, Nüesch-Inderbinnen M, Stephan R. Quinolone Resistance Mechanisms among Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) Producing *Escherichia coli* Isolated from Rivers and Lakes in Switzerland. *PLoS*

One [Internet]. 22 de abril de 2014 [citado 2 de diciembre de 2019];9(4). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3995870/>

109. Gutiérrez-Jiménez J, Luna-Cazáres LM, Mendoza-Orozco MI, Díaz-Marina J, Burguete-Gutiérrez JC, Feliciano-Guzmán JM. Organización, mantenimiento y preservación de la Colección de Cultivos Bacterianos del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas(UNICACH), México. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 2015;35(2):95-102.

## **ANEXOS**

## ANEXO 1

### PROTOCOLO DE TRABAJO

#### PRESERVACIÓN DE LOS AISLADOS DE *Escherichia coli* PRODUCTORAS DE BLEE

- Las *Escherichia coli* productoras de BLEE aisladas en el criovial con TSA, se replicaron en caldo tripticasa soya (CTS).
- Se incubó a 37 °C durante 18 h.
- Del CTS se sembraron en placas con ATS e incubaron a 37 °C durante 18 horas
- Para la preservación de los aislados se inocularon colonias bacterianas en crioviales de 2mL que contenían 1,5mL de caldo tripticasa soya CTS con glicerol al 20% <sup>(109)</sup>.
- Los crioviales se conservan a -80 °C registrando los datos: identificación de la cepa, procedencia, fecha de ingreso, fuente de aislamiento, características biológicas, medio de cultivos usados para aislamiento.

#### CONTROL DE CALIDAD DE DISCOS DE ANTIBIÓTICOS Y MEDIOS DE CULTIVO

Para garantizar la confiabilidad de los resultados, el servicio de Microbiología del HONADOMANI “San Bartolomé”, cuenta con protocolos de las metodologías estandarizadas en el laboratorio. Se realiza control de calidad interno para la identificación bacteriana y antibiograma del sistema automatizado VITEK® 2 Compact y del método manual, además también realizan control de calidad Externo con los programas de PROASECAL de Colombia y PNCQ de Brasil.

En el Instituto de Medicina Tropical, Daniel Alcides Carrión, el método de disco difusión se evaluó según la CLSI-2018 <sup>(45)</sup>, con el cual se realizaron las mediciones de los halos de

los discos de antibióticos. Para evaluar el control de calidad de los medios de cultivo se utilizaron las cepas ATCC:

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Staphylococcus aureus* ATCC 29223
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
- *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853

Para evaluar los discos de quinolonas que se emplearon en la investigación, se utilizó la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922, y se interpretaron según los puntos de corte que establece la CLSI 2018.

Mientras que para evaluar el control de calidad de las betalactamasas de espectro extendido se utilizaron control positivo y control negativo.

En el método de Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR), se realizó mediante la evaluación y optimización del protocolo elaborado por Cattoir et al. <sup>(78)</sup>, el cual ha sido empleado por diferentes investigadores obteniendo buenos resultados. Se utilizaron controles positivos y negativos para evaluar la corrida de electroforesis. Para el control positivo se hizo uso de una cepa con presencia del gen *qnrB* procedente de Argentina.

## PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD MICROBIANA

Se realizó mediante la prueba de difusión en disco de Kirby-Bauer.

- Se reactivaron las cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE en caldo tripticasa de soya a 37°C durante 18 horas.
- Se cultivó en agar tripticasa de soya (TSA) a 37 °C durante 18 horas.
- Las colonias obtenidas en TSA, se sembraron en CHROMagar™ y cultivaron a 37 °C durante 18 horas. Además, las colonias de TSA fueron disueltas en tubos de

ensayo con solución salina obteniendo una turbidez equivalente a 0,5 según la escala de Mac Farland.

- Con un hisopo estéril, se realizó el tapete del inóculo sobre una placa de agar Mueller Hinton.
- Sobre el agar sembrado se colocó los siguientes discos de antibióticos:

Para determinar betalactamasas de espectro extendido se colocaron los discos de antibióticos: ceftazidima, cefotaxima, amoxicilina con ácido clavulánico, aztreonam, cefepime, ertapenem y cefoxitina.

Para determinar la resistencia a quinolonas, los discos de antibiótico que se utilizaron fueron: ácido nalidixico, cinoxacino, norfloxacino, ciprofloxacino, fleroxacino, lomefloxacino, levofloxacino, gatifloxacino y gemifloxacino <sup>(65)</sup>.

Después de colocar los discos de antibióticos, los antibiogramas se colocaron a 37 °C durante 18 - 24 horas en atmósfera aeróbica.

Para medir los halos de inhibición se utilizaron bernier/regla y se interpretó según las tablas del CLSI 2018 clasificándolas como sensibles o resistentes.

#### PARA DETERMINAR EL GEN *qnrB*

##### EXTRACCIÓN DEL ADN GENÓMICO

Se realizó mediante la técnica de ebullición:

- Se colocó una colonia de *Escherichia coli* productoras de BLEE en un volumen total de 100 µL de agua destilada y agitó con el vórtex.
- Se llevó a la etapa de calentamiento a 100 °C durante 10min en el termobloque.

- Estos fueron centrifugados a 14,000 r.p.m. por 4 min.
- Se colectó el sobrenadante en crioviales nuevos, el cual contiene al ADN bacteriano.
- Los ADN obtenidos fueron almacenados a -20 °C.

### REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

- Para realizar la PCR se preparó el master mix, observar la tabla N° 13.

**Tabla N° 13.** Composición del master mix para el gen *qnrB*

MASTER MIX	
➤	Buffer (1X) (libre de magnesio)
➤	MgCl <sub>2</sub> (1mM)
➤	dNTPs (0.4mM)
➤	<i>Taq</i> ADN polimerasa (1unidad)
➤	H <sub>2</sub> O PCR o MilliQ estéril
➤	ADN molde, obtenidos de la extracción bacteriana
➤	Primers, <i>QnrBm</i> -F: GGMATHGAAATTCGCCAATG (0.5uM) y <i>QnrBm</i> -R: TTTGCYGYTCGCCAGTCGAA (0.5uM).

(Fuente: Cattoir et al., 2007 <sup>(78)</sup>)

- La amplificación del ADN se realizara en el termociclador y las condiciones serán como se muestra en la tabla N° 14.



**Tabla N° 14.** Protocolo de PCR del gen *qnrB*

Protocolo del ciclado		
Denaturación inicial	I.	95 °C, 5 min
Denaturación	30 ciclos	II. 94 °C, 45 seg
Hibridación		III. 50 °C, 45 seg
Extensión		IV. 72 °C, 45 seg
Extensión final	V.	72 °C, 10 min
Producto	264 pb	

(Fuente: Cattoir et al., 2007 <sup>(78)</sup>)

Para el control negativo se utilizó la mezcla de la reacción sin ADN, mientras que en el control positivo se utilizó la cepa 5RII el cual contiene el gen *qnrB* en su ADN.

#### ELECTROFORESIS

- Se preparó agarosa al 1,5%, con 60 mL de buffer TAE 1X y 0.9g de agarosa. Para observar las bandas se agregó 3 µL de SYBER Safe®.
- En los posillos generados por el peine, se cargaron el ladder y los productos amplificados en la PCR.
- Para cargar a los posillos se mezclaron 8 µL de producto amplificado con 1 µL de ADN loading. En cada posillo se cargó 8 µL de la mezcla.
- Las condiciones de la corrida fueron: Tiempo, 40 minutos; Voltaje, 80V y Buffer de corrida, TAE (1X).
- Al terminar la corrida, fotografiar con un transiluminador de luz ultravioleta a 305 nm para analizar e identificar las bandas según los pares de bases.

## ANEXO 2

### PUNTOS DE CORTE DE LA ZONA DEL DIÁMETRO Y MIC DE LAS QUINOLONAS PARA ENTEROBACTERIAS, CLSI 2018

Agentes Antimicrobianos	Contenido de disco	Categorías interpretativas y punto de corte de la Zona de Diámetro (mm)				Categorías interpretativas y punto de corte del MIC (µg/mL)			
		S	SDD	I	R	S	SDD	I	R
Quinolonas y Fluoroquinolonas para Enterobacteriaceae excepto Salmonella spp.									
Ciprofloxacino	5 µg	≥21	/	16-20	≤15	≤1	/	2	≥4
Levofloxacino	5 µg	≥17	/	14-16	≤13	≤2	/	4	≥8
Cinoxacino	100 µg	≥19	/	15-18	≤14	≤16	/	32	≥64
Enoxacino	10 µg	≥18	/	15-17	≤14	≤2	/	4	≥8
Gatifloxacino	5 µg	≥18	/	15-17	≤14	≤2	/	4	≥8
Gemifloxacino	5 µg	≥20	/	16-19	≤15	≤0.25	/	0.5	≥1
Grepafloxacino	5 µg	≥18	/	15-17	≤14	≤1	/	2	≥4
Lomefloxacino	10 µg	≥22	/	19-21	≤18	≤2	/	4	≥8
Ácido nalidíxico	30 µg	≥19	/	14-18	≤13	≤16	/	/	≥32
Norfloxacino	10 µg	≥17	/	13-16	≤12	≤4	/	8	≥16
Fleroxacino	5 µg	≥19	/	16-18	≤15	≤2	/	4	≥8

\*TABLA 2A- Enterobacteriaceae, CLSI 2018 <sup>(40)</sup>

### PUNTOS DE CORTE DE LA ZONA DEL DIÁMETRO Y MIC DE LOS INHIBIDORES DE BETALACTAMASAS Y MONOBACTÁMICOS PARA ENTEROBACTERIAS, CLSI 2018

Agentes Antimicrobianos	Contenido de disco	Categorías interpretativas y punto de corte de la Zona de Diámetro (mm)				Categorías interpretativas y punto de corte del MIC (µg/mL)			
		S	SDD	I	R	S	SDD	I	R
Combinación de agentes betalactámicos									
Amoxicilina – clavulánico	20/10 µg	≥18	/	14-17	≤13	≤8/4	/	16/8	≥32/16
Ampicilina – sulbactam	10/10 µg	≥15	/	12-14	≤11	≤8/4	/	16/8	≥32/16
Monobactámicos									
Aztreonam	30 µg	≥21	/	18-20	≤17	≤4	/	8	≥16

\*TABLA 2A- Enterobacteriaceae, CLSI 2018 <sup>(40)</sup>

PUNTOS DE CORTE DE LA ZONA DEL DIÁMETRO Y MIC DE LAS  
CEFALOSPORINAS PARA ENTEROBACTERIAS, CLSI 2018

Agentes Antimicrobianos	Contenido de disco	Categorías interpretativas y punto de corte de la Zona de Diámetro (mm)				Categorías interpretativas y punto de corte del MIC (µg/mL)			
		S	SDD	I	R	S	SDD	I	R
Céfemios(Parenteral) incluye cefalosporinas de I, II, III y IV generación									
Cefazolina	30 µg	≥15	/	/	≤14	≤16	/	/	≥32
Cefepime	30 µg	≥25	19-24	/	≤18	≤2	4 8	/	≥16
Cefotaxime	30 µg	≥26	/	23-25	≤22	≤1	/	2	≥4
Ceftriaxone	30 µg	≥23	/	20-22	≤19	≤1	/	2	≥4
Cefotetan	30 µg	≥16	/	13-15	≤12	≤16	/	32	≥64
Cefoxitina	30 µg	≥18	/	15-17	≤14	≤8	/	16	≥32
Cefuroxime (Parenteral)	30 µg	≥18	/	15-17	≤14	≤8	/	16	≥32
Ceftazidime	30 µg	≥21	/	18-20	≤17	≤4	/	8	≥16
Cefmetazole	30 µg	≥16	/	13-15	≤12	≤16	/	32	≥64

\*TABLA 2A- Enterobacteriaceae, CLSI 2018 <sup>(40)</sup>

PUNTOS DE CORTE DE LA ZONA DEL DIÁMETRO Y MIC DE LOS  
CARBAPENÉMICOS PARA ENTEROBACTERIAS, CLSI 2018

Agentes Antimicrobianos	Contenido de disco	Categorías interpretativas y punto de corte de la Zona de Diámetro (mm)				Categorías interpretativas y punto de corte del MIC (µg/mL)			
		S	SDD	I	R	S	SDD	I	R
Carbapenems									
Doripenem	10 µg	≥23	/	20-22	≤19	≤1	/	2	≥4
Ertapenem	10 µg	≥22	/	19-21	≤18	≤1.5	/	1	≥2
Imipenem	10 µg	≥23	/	20-22	≤19	≤1	/	2	≥4
Meropenem	10 µg	≥23	/	20-22	≤19	≤1	/	2	≥4

### ANEXO 3

#### FICHA DE REGISTRO DE *Escherichia coli* PRODUCTORAS DE BLEE

FICHA DE REGISTRO POR DÍA DE *Escherichia coli* PRODUCTORAS DE BLEE EN HONODOMANI SB  
JUNIO-AGOSTO 2018

FECHA DE RECOLEC. FECHA de T.M	UROCULTIVOS		UROCULTIVOS TOTAL	UROCULTIVOS POSITIVOS	E. coli aisladas	E. coli BLEE POSITIVOS	OBS.
	M	E					
31/05/18							
01/06/18							
02/06/18							
03/06/18							
04/06/18							
05/06/18							
06/06/18							
07/06/18							
08/06/18							
09/06/18							
10/06/18							
11/06/18							
12/06/18							
13/06/18							
14/06/18							
15/06/18							
16/06/18							
17/06/18							
18/06/18							
19/06/18							
20/06/18							
21/06/18							
22/06/18							
23/06/18							
24/06/18							
25/06/18							

\*ABREVIATURAS. M: pacientes ambulatorios, E: pacientes hospitalizados, FECHA DE T.M : fecha de recepción de muestra, BLEE: betalactamasas de espectro extendido.

MINISTERIO DE SALUD  
HONDOMANI SAN BARTOLOMÉ  
Lic. T.M. Javier Orlando Soto Pastrán  
CTMP. 0797

Esther Valencia Bazalar  
Tecnólogo Médico  
CTMP. 10185

## ANEXO 4

### FICHA DE RECOLECCIÓN DE AISLADOS DE *Escherichia coli* PRODUCTORAS DE BLEE

FICHA DE RECOLECCIÓN DE AISLADOS DE <i>Escherichia coli</i> productoras de BLEE (Junio – Agosto del 2018)																
N°	FECHA DE T.M.	CÓDIGO DE MUESTRA	SEXO		EDAD	RESULTADO - Disco Difusión (mm)								BLEE		OBS
			F	M		AMC	CAZ	CTX	CRO	FEP	FOX	ETP	ATM	POS	NEG	
1																
2																
3																
4																
5																
6																
7																
8																
9																
10																
11																
12																
13																
14																

**\*ANTIBIÓTICOS.** AMC: amoxicilina/ ácido clavulánico, CAZ: Cefazidima, CRO: ceftriaxona, FEP: cefepime, ETP: Ertapenem, ATM: astreonam, CTX: ceftotaxima, FOX: cefoxitina. **ABREVIATURAS.** POS: positivo, NEG: negativo, H.C: historia clínica, F: femenino, M: masculino, FECHA DE T. M: fecha de recepción de muestra, BLEE: betalactamasas de espectro extendido.



MINISTERIO DE SALUD  
HONADOMANI SAN BARTOLOME  
Lic. T.M. Javier Orlando Soto Pastran  
CTMP. 0757



Esther Valencia Bazalar  
Tecnólogo Médico  
CTMP. 10185



# ANEXO 5

## FICHA DE RESULTADO DE MECANISMOS DE RESISTENCIA

### FICHA DE RESULTADOS DE MECANISMOS DE RESISTENCIA

N°	CÓDIGO DE MUESTRA	DISCOS DE ANTIBIÓTICOS						BLEE		QUINOLONAS					RESISTENCIA A QUINOLONAS		qnrB		OBS	
		OXIMINO-CEFALOSPORINAS			AMC	ATM	FOX			ETP	1RA GEN	2DA GEN		3RA GEN						4TA GEN
		FEP	CTX	CAZ				NAL	CIP			FLE	LOM		LVX	GEM	S	R		
		POS	NEG																	
1																				
2																				
3																				
4																				
5																				
6																				
7																				
8																				
9																				
10																				
11																				
12																				
13																				
14																				
15																				
16																				
17																				

\*ANTIBIÓTICOS. FEP: cefepime, CTX: cefotaxima, CAZ: ceftazidima, AMC: amoxicilina/ ácido clavulánico, ATM: astreonam, FOX: cefoxitina, ETP: ertapenem.

\*ABREVIATURAS. P: presente, A: ausente. S: sensible, R: resistente, POS: positivo, NEG: negativo, BLEE: betalactamasas de espectro extendido.

MINISTERIO DE SALUD  
HONORADO MANRIQUE SAN BARTOLOME  
Lic. T.M. Jander Damián Sotelo Pastora  
CTMP. 10185

Esther Valencia Bazalar  
Tecnólogo Médico  
CTMP. 10185

# ANEXO 6

## OPERALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLES DE ESTUDIO	DEFINICIÓN DE VARIABLE	DIMENSIÓN	INDICADOR	CRITERIO DE MEDICION	VALORES	ESCALA DE MEDICION	TÉCNICA	INSTRUMENTO DE MEDICION
Gen <i>qnrB</i>	Es un gen plasmídico que pertenece a la familia de pentapeptidos repetidos y causa baja resistencia a quinolonas.	Bandas de la electroforesis	Número pares de bases	264pb	Presencia	Nominal	PCR	Termociclador
					Ausencia			
Perfil de susceptibilidad a quinolonas	Es la cualidad microbiológica, en el cual las bacterias pueden ser sensibles (inhibidas o/y eliminadas) o Resistentes a quinolonas.	Primera generación - Ácido nalidixico	Tamaño de halo	≥19 mm	sensible	Nominal	Disco difusión	Bernier/ Regla
				≤13 mm	Resistente			
				14-18 mm	Intermedio			
		Segunda generación – ciprofloxacino		≥21 mm	sensible	Nominal		
				≤15 mm	Resistente			
				16-20 mm	intermedio			
		Tercera generación – levofloxacino		≥17 mm	sensible	Nominal		
				≤13 mm	Resistente			
				14-16 mm	intermedio			
		Cuarta generación – Gemifloxacino		≥ 20mm	sensible	Nominal		
				≤15 mm	Resistente			
				16-19 mm	Intermedio			

## ANEXO 7

### VALIDACIÓN DE INSTRUMENTO DE INVESTIGACIÓN

Proyecto de Investigación: **Frecuencia del gen *qnrB* y perfil de susceptibilidad a quinolonas en *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido aislados de urocultivos en el Hospital Nacional Docente Madre Niño “San Bartolomé”. Lima, Perú – 2018.**

Nombre del egresado(a): Cyntia Mariela Mayta Fernández

Nombre del Juez Experto:

-----

### ESCALA DE CALIFICACIÓN

Marque con una X (aspa) en SI o NO en cada criterio según su opinión

Nº	CRITERIOS	SI	NO	OBSERVACIONES
1	El instrumento recoge información que permite dar respuesta al problema de investigación.			
2	El instrumento propuesto responde al (los) objetivos(s) de estudio.			
3	La estructura del instrumento es adecuado.			
4	Los ítems del instrumento responden a la operacionalización de la variable.			
5	La secuencia presentada facilita el desarrollo del instrumento.			
6	Los ítems son claros y entendibles.			
7	El número de ítems es adecuado para su aplicación.			

SUGERENCIAS:.....  
.....  
.....  
.....  
.....

\_\_\_\_\_  
Firma del Juez Experto



## ANEXO 8

### VALIDACIÓN DE INSTRUMENTO DE INVESTIGACIÓN

Proyecto de Investigación: Frecuencia del gen *qnrB* y perfil de susceptibilidad a quinolonas en *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido aislados de urocultivos en el Hospital Nacional Docente Madre Niño "San Bartolomé".  
Lima, Perú – 2018.

Nombre del egresado(a): Cyntia Mariela Mayta Fernández

Nombre del Juez Experto: Lic. TM Javier Orlando Soto Pastrana

#### ESCALA DE CALIFICACIÓN

Marque con una X (aspa) en SI o NO en cada criterio según su opinión

N°	CRITERIOS	SI	NO	OBSERVACIONES
1	El instrumento recoge información que permite dar respuesta al problema de investigación.	X		
2	El instrumento propuesto responde al (los) objetivos(s) de estudio.	X		
3	La estructura del instrumento es adecuado.	X		
4	Los ítems del instrumento responden a la operacionalización de la variable.	X		
5	La secuencia presentada facilita el desarrollo del instrumento	X		
6	Los ítems son claros y entendibles.	X		
7	El número de ítems es adecuado para su aplicación.	X		

SUGERENCIAS:

  
 Lic. TM Javier Orlando Soto Pastrana  
 C.M. 0757

Firma del Juez Experto

## ANEXO 9

### VALIDACIÓN DE INSTRUMENTO DE INVESTIGACIÓN

Proyecto de Investigación: Frecuencia del gen *qnrB* y perfil de susceptibilidad a quinolonas en *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido aislados de urocultivos en el Hospital Nacional Docente Madre Niño "San Bartolomé".  
Lima, Perú – 2018.

Nombre del egresado(a): Cytia Mariela Mayta Fernández

Nombre del Juez Experto: Lic. TM Esther Valencia Bazalar

#### ESCALA DE CALIFICACIÓN

Marque con una X (aspa) en SI o NO en cada criterio según su opinión

N°	CRITERIOS	SI	NO	OBSERVACIONES
1	El instrumento recoge información que permite dar respuesta al problema de investigación.	X		
2	El instrumento propuesto responde al (los) objetivo(s) de estudio.	X		
3	La estructura del instrumento es adecuado.	X		
4	Los ítems del instrumento responden a la operacionalización de la variable.	X		
5	La secuencia presentada facilita el desarrollo del instrumento.	X		
6	Los ítems son claros y entendibles.	X		
7	El número de ítems es adecuado para su aplicación.	X		

#### SUGERENCIAS:

.....

.....



.....

  
Lic. Esther Valencia Bazalar  
Tecnólogo Médico  
CTMP. 10185

Firma del Juez Experto

## ANEXO 10

### RESOLUCIÓN DE DECANATO DE LA APROBACIÓN DEL PROYECTO DE TESIS

 <b>UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS</b> (Universidad del Perú DECANA DE AMÉRICA) <b>FACULTAD DE MEDICINA</b> <small>«Año de la lucha contra la corrupción y la impunidad»</small> 	
Lima, 03 de setiembre de 2019	
<b>RESOLUCIÓN DE DECANATO N° 2089-D-FM-2019</b>	
Visto el Expediente N° 16839-FM-2019 de fecha 02 de setiembre de 2019 de la Unidad de Trámite Documentario y Archivo de la Facultad de Medicina, sobre aprobación de Proyectos de Tesis.	
<b>CONSIDERANDO:</b>	
Que, mediante Resolución de Decanato N° 1569-D-FM-2013 ratificada con Resolución Rectoral N° 01717-R-2016 de fecha 19 de abril de 2016, se aprueba el Reglamento para la Elaboración de Tesis para optar el Título Profesional en las Escuelas Académico Profesionales de la Facultad de Medicina, que en su <b>Capítulo I. Introducción, Art. 2:</b> establece que: <i>"La tesis debe ser un trabajo inédito de aporte original, por la cual se espera que los estudiantes adquieran destrezas y conocimientos que los habiliten para utilizar la investigación como un instrumento de cambio, cualquiera sea el campo del desempeño"</i> así mismo, en su <b>Capítulo VI: Del Asesoramiento de la tesis: Art. 28</b> establece que: <i>"La Dirección de la EAP con la opinión favorable del Comité de Investigación, solicitará a la Dirección Académica la Resolución Decanal respectiva para proceder a su ejecución"</i> ;	
Que, mediante Oficios N° 1483-1485-1486/FM-EPTM/2019, el Director de la Escuela Profesional de Tecnología Médica, informa que los Proyectos de Tesis que figuran en la propuesta cuentan con opinión favorable de la Comisión de Investigación de la citada Escuela para su ejecución; y,	
Estando a lo establecido por el Estatuto de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y las atribuciones conferidas por la Ley Universitaria N° 30220;	
<b>SE RESUELVE:</b>	
1° Aprobar los Proyectos de Tesis, según detalle:	
<b>Estudiante:</b> Mareli Lisset Oliva Gonzáles Código de matrícula N° 15010435 E.P. de Tecnología Médica Área: Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica	<b>Título del Proyecto de Tesis:</b> "Anomalías cromosómicas en parejas que presentan abortos espontáneos, en el Hospital Nacional Docente Madre Niño "San Bartolomé", Lima - 2019"
<b>Asesor:</b> Mg. Eduardo Augusto Verástegui Lara Código docente: 073784	
<b>Estudiante:</b> Cynthia Mariela Mayta Fernández Código de matrícula N° 13010317 E.P. de Tecnología Médica Área: Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica	<b>Título del Proyecto de Tesis:</b> "Frecuencia del gen <i>qnrB</i> y perfil de susceptibilidad a quinolonas en <i>Escherichia coli</i> productoras de betalactamasas de espectro extendido aislados de urocultivos en el Hospital Nacional Docente Madre Niño "San Bartolomé", Lima, Perú - 2018"
<b>Asesor:</b> Lic. TM. Carlos Raúl Sevilla Andrade Código docente: 098388	

//...

Av. Grau 755 - Lima 1. Apartado Postal 529 - Lima 100 - Perú Telf. (511) 3283229 - (511) 3283238  
Web: [www.medicina.unmsm.edu.pe](http://www.medicina.unmsm.edu.pe)





**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**  
(Universidad del Perú DECANA DE AMÉRICA)  
**FACULTAD DE MEDICINA**

«Año de la lucha contra la corrupción y la impunidad»



...//

**Cont. RESOLUCIÓN DE DECANATO N° 2089-D-FM-2019**

<b>Estudiante:</b> María Belen Canales Medina Código de matrícula N° 15010178 E.P. de Tecnología Médica Área: Radiología	<b>Título del Proyecto de Tesis:</b> "Variación del artefacto metálico usando magic en resonancia magnética de cerebro, Clínica San Borja, Sanna, Lima - 2019"
<b>Asesor:</b> Lic. Luis Frank Bernal Quispe Código docente: 0A2237	

2° Encargar a la Escuela Profesional de Tecnología Médica el cumplimiento de la presente resolución.

Regístrese, comuníquese, archívese.



Decanato  
EPTM  
Intermedios

/v/n.

*[Firma]*

**DR. ANGELA R. CORNEJO V. DE ESPEJO**  
Vicedecana Académica



*[Firma]*

**DR. SERGIO G. RONCEROS MEDRANO**  
Decano

## ANEXO 11

### APROBACIÓN DEL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN Y COMITÉ INSTITUCIONAL DE HONADOMANI "SAN BARTOLOMÉ"

	PERU	Ministerio de Salud	Hospital Nacional Docente Madre Niño "San Bartolomé"	Oficina de Apoyo a Docencia e Investigación	
---	------	---------------------	--	---	---

*"Año de la lucha contra la corrupción y la impunidad"*

Lima, 03 de setiembre de 2019

**OFICIO N°0400-2019-OADI-HONADOMANI-SB**

**CYNTIA MARIELA MAYTA FERNÁNDEZ**  
Investigadora principal  
Presente.-

**Expediente. N°0268-19**

---

Tengo el agrado de dirigirme a usted para saludarla cordialmente y en relación al Proyecto de Tesis titulado:

**"FRECUENCIA DEL GEN *gntB* Y PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD A QUINOLONAS EN *ESCHERICHIA COLI* PRODUCTORAS DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO AISLADOS DE UROCULTIVOS EN EL HOSPITAL NACIONAL DOCENTE MADRE NIÑO "SAN BARTOLOMÉ". LIMA, PERÚ- 2018".**

Al respecto se informa lo siguiente:

El planteamiento, el método para el análisis de resultados estadístico propuesto para la evaluación de los resultados son apropiados para el estudio.

**Conclusión:**

El Comité Investigación del HONADOMANI San Bartolomé y el Comité Institucional de Ética en Investigación, aprueban de manera expedita el proyecto de Investigación con **Exp. N°0268-19**.

Hago propicia la oportunidad para renovar los sentimientos de nuestra consideración y estima personal.

Atentamente.



MINISTERIO DE SALUD  
HOSPITAL NACIONAL DOCENTE MADRE NIÑO  
SAN BARTOLOMÉ

*M. C. HUGO DELGADO BARTRA*  
Jefe de Apoyo a la Docencia e Investigación

HDB/vma  
cc.archivo

Av. Alfonso Ugarte 825 4to piso/Lima Perú

Teléfono 2010400 anexo 162

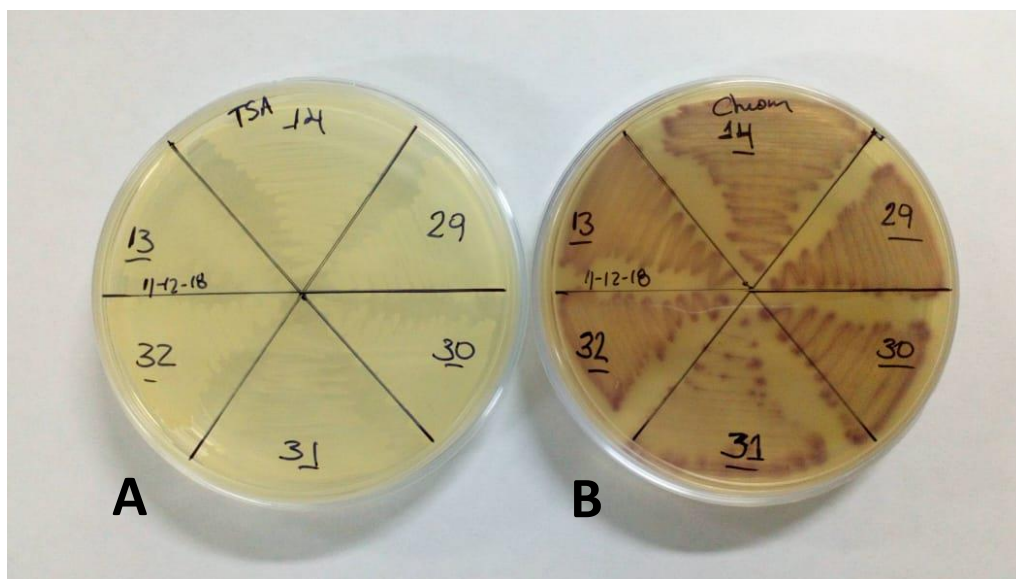
## ANEXO 12

### ABREVIATURAS

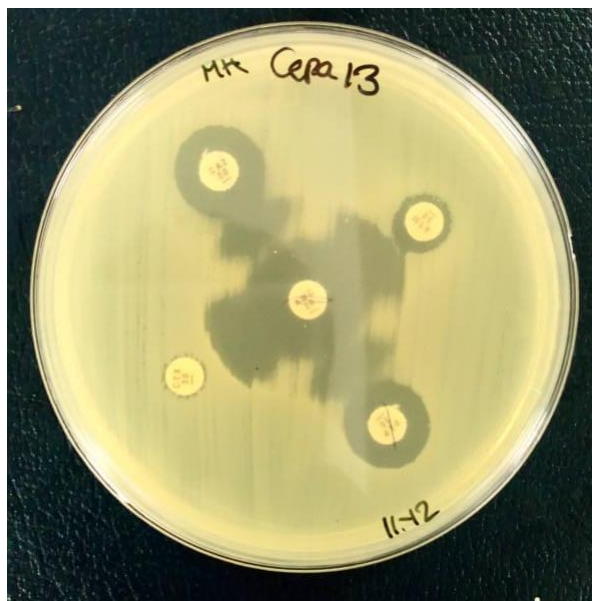
- NA: Ácido nalidíxico.
- CIN: Cinoxacino.
- CIP: Ciprofloxacino.
- NOR: Norfloxacino.
- OFX: Ofloxacino.
- LOM: Lmefloxacino.
- FLE: Fleroxacino.
- GAT: Gatifloxacino.
- GEM: Gemifloxacino.
- CAZ: Ceftazidima.
- ATM: Astreonam.
- PMQR: Resistencia a quinolona mediada por plásmido.
- QRDR: Región determinante de resistencia a quinolona.
- BLEE: Betalactamasas de espectro extendido.
- CMI: Concentración mínima inhibitoria.
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.
- ATCC: *American type culture collection*.
- TAE: Tris, acetato y ácido etilendiaminotetraacético.
- MDR: *Multidrug resistance*. Multidrogo resistente.

## ANEXO 13

### FOTOGRAFÍAS DE LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO DE TESIS

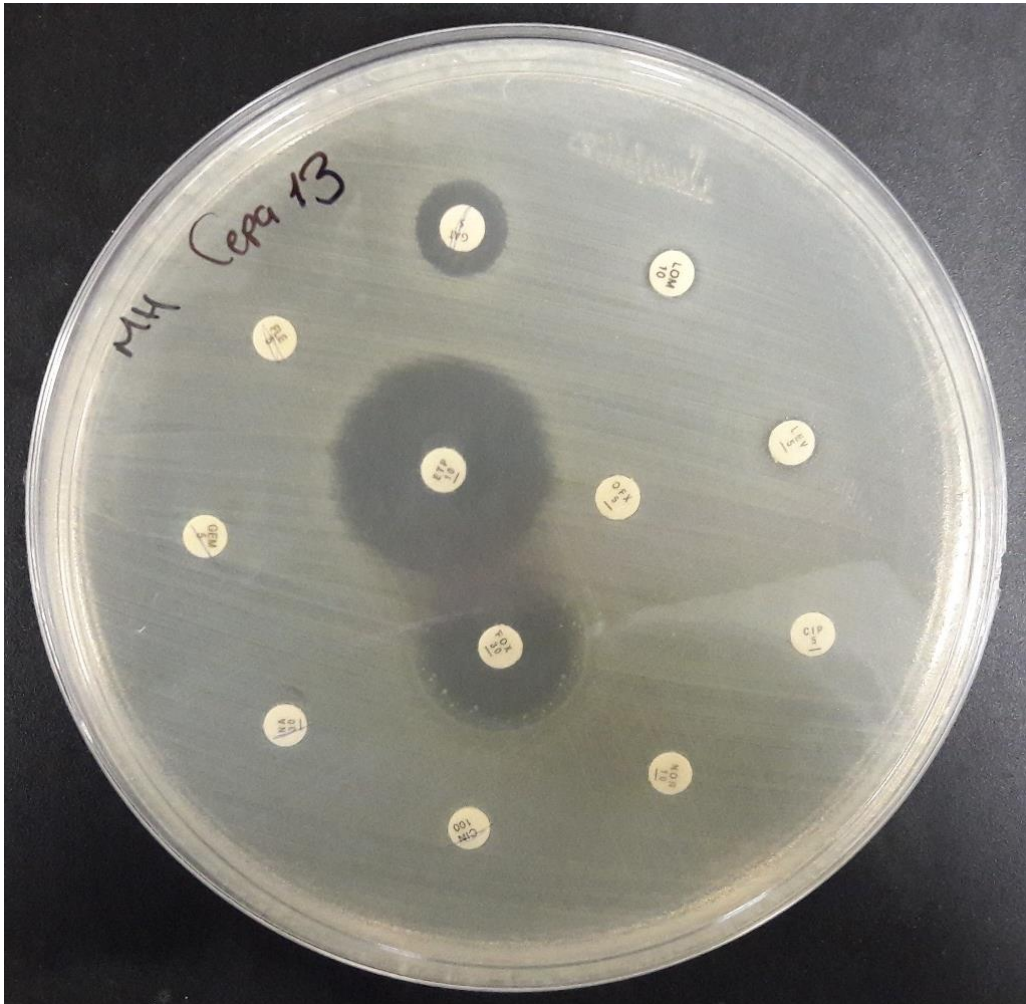


**Fotografía N° 5.** Cultivo de aislados de *Escherichia coli* productoras de BLEE en medios de TSA y CHROMagar™. **A.** Agar tripticasa soya. **B.** CHROMagar™.



**Fotografía N° 6.** Método de Jarlier la detección de BLEE.





**Fotografía N° 7.** Antibiograma de *Escherichia coli* productoras de BLEE para la determinación del perfil de susceptibilidad a quinolonas.





**Fotografía N° 7.** Procesamiento del proyecto de tesis en el Instituto de Medicina Tropical Daniel Alcides Carrión.

ANEXO 14  
DOCUMENTO DE APROBACIÓN DE TURNITIN



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
Universidad del Perú, Decana de América  
Facultad de Medicina  
Escuela Profesional de Tecnología Médica



**INFORME DE EVALUACIÓN DE ORIGINALIDAD**

El Director de la Escuela Profesional de Tecnología Médica, Mg. Paredes Arrascue, José Antonio; que suscribe, hace constar que

Para la tesis para optar el título profesional de Licenciado(a) en Tecnología Médica, en el Área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica:

**“Frecuencia del gen *qnrB* y perfil de susceptibilidad a quinolonas en *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido aislados de urocultivos en el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé. Lima, Perú - 2018”**

**Autor:** Mayta Fernández, Cyntia Mariela

Presentó solicitud de evaluación de originalidad el 05 de marzo del 2020 y el 05 de marzo del 2020 (UTC-0800) se aplicó el programa informático de similitudes en el software TURNITIN con **Identificador de la entrega N°: 1270056148**

En la configuración del detector se:

- Excluyó textos entrecomillados.
- Excluyó bibliografía.
- Excluyó cadenas menores a 40 palabras.
- Excluyó anexos.

**El resultado final de similitudes fue del 6 %, según descripción adjunta.**

**EL DOCUMENTO ARRIBA SEÑALADO CUMPLE CON LOS CRITERIOS DE ORIGINALIDAD**

Operador del software el profesor: Dr. Miguel Hernán Sandoval Vegas.

Lima, 05 de marzo de 2020.

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
  
**Mg. JOSÉ ANTONIO PAREDES ARRASCUÉ**  
**DIRECTOR**  
**E.A.P. TECNOLOGÍA MÉDICA**